



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS
ACEITOSOS EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL
QUILCATE, CAJAMARCA, 2022**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. MARY CARMEN CELIS APOLITANO

ASESOR:

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CO-ASESOR:

M. Cs. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

CAJAMARCA – PERÚ

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria -1Q -115- Av. Atahualpa Nº 1050-Cajamarca - ☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS ACEITOSOS EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE, CAJAMARCA, 2022**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **MARY CARMEN CELIS APOLITANO**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 16% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesor al Docente **Dr. Marco A. Rivera Jacinto**, Co- Asesor **M.Cs. Omar D. Pairazamán Quiroz**.

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 23 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
[Signature]
Dra. Martha Vicenta Abanto Villar
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COPYRIGHT©
MARY CARMEN CELIS APOLITANO
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Celis, M. 2023. **Efecto de la temperatura y la concentración de residuos aceitosos en la producción de polihidroxicanoatos por bacterias termófilas aisladas de la fuente termal Quilcate, Cajamarca, 2022** / Mary Carmen Celis Apolitano.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: M. Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2024.

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS
ACEITOSOS EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE,
CAJAMARCA, 2022**

AUTORA: Mary Carmen Celis Apolitano.

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto.

CO-ASESOR: M. Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz.

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



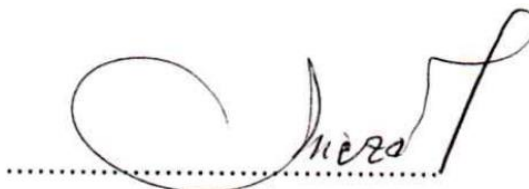
.....
Presidente

Dr. Luis Gilberto García Izquierdo



.....
Secretario

M. Cs. William Edgardo Soriano Castillo



.....
Vocal

Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca, 2024 – Perú.



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 09:00 am. del 07 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente ID-106 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Efecto de la temperatura y la concentración de residuos aceitosos en la producción de polihidroxicarboxilatos por bacterias termófilas aisladas de la fuente termal Quilcate, Cajamarca, 2022"

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

MARY CARMEN CELIS APOLITANO

Siendo las 09:50 am. del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Dr. Luis Gilberto García Izquierdo), Secretario(a) (MCS. William Edgardo Soriano Castillo), Vocal (Dr. Demetrio Cieza Yrigoin), Accesitario (MCS. Arturo Ulises Diaz Aliaga), Asesor (a) (Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto), and Co Asesor (a) (MCS Omar Daniel Parazaman Quisoz).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

La presente tesis está dedicada a mis mamás; Martha y Mary, quienes me han enseñado a luchar por mis metas, ser perseverante y nunca rendirme ante las adversidades de la vida; ellas han sido, son y siempre serán mi mayor inspiración y motivación para seguir adelante

Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos.

Marie Curie

(Física y química francesa)

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado vida, salud y sabiduría para culminar con éxito el desarrollo de mi tesis a pesar de las adversidades. A mi familia, en especial a Martha y Mary quienes me brindaron su amor incondicional y apoyo emocional durante este largo proceso, gracias por creer en mí siempre y darme todo lo necesario para ser una excelente profesional. A Constante Sánchez por haber formado parte de mi crecimiento personal y académico.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi asesor Dr. Marco A. Rivera Jacinto y a mi Co-asesor Mg. Omar Pairazamán quienes con su sabiduría y experiencia como investigadores guiaron este trabajo de investigación de manera excepcional. Al Ing. Juan Carlos Flores por haber tenido la amabilidad de prestarme material de laboratorio para ejecutar con éxito algunos ensayos de esta tesis.

A CONCYTEC PROCIENCIA, que en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica 2019-01 financió el Proyecto Semilla “Potencial genético con aplicación biotecnológica industrial y ambiental de la microbiota termófila de las fuentes geotermales de la Región Cajamarca” [número de contrato 395-2019-FONDECYT] del cual forma parte esta tesis.

Por último, agradecer a todos los docentes que formaron parte de mi camino universitario, quienes me transmitieron los conocimientos necesarios para hoy poder culminar satisfactoriamente esta tesis. A la Universidad por acogerme durante este periodo en sus espacios, aulas y laboratorios.

Tabla de contenido

Título	xiii
Resumen	xiv
Abstract.....	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la investigación.....	4
2.2. Modelo conceptual.....	7
2.2.1. Fuentes termales.....	7
2.2.2. Bacterias termófilas y su potencial biotecnológico.....	8
2.2.3. Polihidroxicanoatos (PHA)	9
2.2.3.1. Clasificación y tipos de PHA	10
2.2.3.2. Vías de síntesis de PHA	11
2.2.3.3. Factores que afectan la producción de PHA	12
2.2.3.4. Producción de PHA por bacterias	14
2.2.4. Potenciales fuentes de carbono reutilizables para producir PHA	15
2.2.5. Métodos de extracción de PHA	18
2.2.6. Aplicaciones de los PHA	19
CAPÍTULO III	20
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	20
3.1. Nivel de investigación	20
3.2. Tipo y diseño de la investigación	20
3.3. Material biológico.....	20
3.4. Unidad de análisis.....	20
3.4.1 Procedimientos.....	20
3.4.1.1. Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA	21
3.4.1.2. Screening de la producción cuantitativa de PHA.....	22
3.4.1.3. Efecto de la variación de temperatura y concentración de residuos aceitosos en la producción de PHA.....	24

3.4.1.4. Procesamiento y análisis de datos	25
CAPÍTULO IV	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Resultados	27
4.1.1. Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA	27
4.1.2. Screening de la producción cuantitativa de PHA	30
4.1.3 Efecto de la variación de temperatura y concentración de residuos aceitosos en la producción de PHA	32
4.2. Discusión	37
CAPÍTULO V	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
5.1. Conclusiones	46
5.2. Recomendaciones	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÉNDICES	53
ANEXOS	61

Lista de abreviaturas

PHA : Polihidroxicanoatos

PHB : Polihidroxiacetatos

scl-PHA : Polihidroxicanoatos de cadena corta.

DCW : Peso celular seco.

ARC : Aceite residual de cocina

RPM : Revoluciones por minuto

NGIB : Biotecnología Industrial de Próxima Generación

Glosario

Ambientes extremos: Son entornos extremos que representan ecosistemas únicos (presentan variadas concentraciones de temperaturas, presión, acidez, salinidad), los cuales albergan una nueva biodiversidad de microbios, incluyendo arqueas, bacterias y hongos (Obulisamy y Mehariya, 2021).

Termófilos: Son microorganismos altamente adaptados y metabólicamente activos, su desarrollo se da en ambiente calientes, con una temperatura de crecimiento dentro del rango de 45 - 80 °C (Yadav *et al.*, 2019).

Biopolímeros: Los biopolímeros son polímeros producidos a partir de fuentes naturales sintetizados químicamente a partir de un material biológico o totalmente biosintéticos por organismos vivos (Smith, Moxon y Morris, 2016).

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE
RESIDUOS ACEITOSOS EN LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS TERMÓFILAS
AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE, CAJAMARCA,**

2022

Resumen

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son inclusiones citoplasmáticas en forma de gránulos redondos, producidos por diversos microorganismos incluyendo los que habitan ambientes extremos, estos gránulos pueden acumularse como fuente de reserva cuando los microorganismos están expuestos a condiciones de estrés. En el presente estudio se evaluó el efecto de variaciones en temperatura y concentraciones de sustrato en la producción de PHA por bacterias termófilas criopreservadas en el Laboratorio de Microbiología de la UNC. Siete aislamientos bacterianos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Aneurinibacillus* y *Brevibacillus* fueron seleccionados de un total 106, por crecimiento a 45 °C en caldo PHA modificado con 2 % de aceite residual de cocina (ARC) y la presencia de gránulos de PHA visualizados mediante tinción con Negro Sudán B. Los aislamientos bacterianos seleccionados fueron sometidos a diversos ensayos bajo temperaturas de 45, 50, 55 °C y concentraciones de 2, 4 y 6 % de ARC. La temperatura de 50 °C y la concentración de ARC al 2 % estimularon una mayor producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60, con rendimientos de 57.80 ± 0.03 y 54.61 ± 0.03 %, respectivamente. Se concluye que la temperatura de 50 °C y la concentración de 2 % de ARC estimulan la mayor producción de PHA en las bacterias termófilas seleccionadas en este estudio.

Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, PHA, biopolímeros, aceite residual de cocina, bacterias termófilas.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are cytoplasmic inclusions in the form of round granules, produced by various microorganisms including those that inhabit extreme environments. These granules can accumulate as a reserve source when microorganisms are exposed to stress conditions. In the present study, the effect of variations in temperature and substrate concentrations on the production of PHA by cryopreserved thermophilic bacteria in the UNC Microbiology Laboratory was evaluated. Seven bacterial isolates belonging to the genera *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Aneurinibacillus* and *Brevibacillus* were selected from a total of 106, by growth at 45 °C in PHA broth modified with 2 % residual cooking oil (ARC) and the presence of PHA granules visualized by staining. with Sudan Black B. The selected bacterial isolates were subjected to various tests under temperatures of 45, 50, 55 °C and concentrations of 2, 4 and 6 % ARC. The temperature of 50 °C and the concentration of ARC at 2 % stimulated a greater production of PHA by *B. licheniformis* Q25 and *A. thermoaerophilus* Q60, with yields of 57.80 ± 0.03 and 54.61 ± 0.03 %, respectively. It is concluded that the temperature of 50 °C and the concentration of 2 % of ARC stimulate the highest production of PHA in the thermophilic bacteria selected in this study.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, PHA, biopolymers, residual cooking oil, thermophilic bacteria.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHA) conocidos también como bioplásticos son biopolímeros sintetizados de forma natural principalmente por bacterias, arqueas y algunas cianobacterias, las cuales al experimentar un desequilibrio de nutrientes en su entorno tienen la capacidad de acumularlos intracelularmente en forma de gránulos esféricos lipídicos como fuentes de reserva (Li y Wilkins, 2020). En la actualidad, diversos investigadores han centrado su interés en el estudio de estos biopolímeros debido a sus características excepcionales de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Nanda *et al.*, 2022), hasta el momento se han caracterizado más de 150 tipos diferentes de estos y se han reportado que más de 300 especies bacterianas son capaces de sintetizarlos, razón por la cual vienen siendo ampliamente estudiados para ser utilizados en el campo biomédico y a nivel industrial como sustitutos de los plásticos sintéticos (Li y Wilkins, 2020).

Uno de los grandes retos de la producción de PHA a nivel industrial es el alto costo de los sustratos utilizados, ya que, estos pueden constituir hasta el 50% del costo total de del bioproceso; actualmente, la búsqueda de fuentes de carbono renovables como los residuos lipídicos han llamado la atención de los investigadores, debido a su bajo costo, accesibilidad y alto contenido de carbono; estos desechos (como los aceites residuales de cocina, ARC) se pueden obtener de industrias de procesamiento de alimentos (Lim *et al.*, 2023), de restaurantes y de los mismos hogares como residuos domésticos.

La mayoría de los bioprocesos utilizan bacterias mesófilas, las cuales por lo general enfrentan problemas de contaminación cruzada por otra microbiota mesófila, razón por

la cual se dificulta la producción del biopolímero (Chavan *et al.*, 2021). Frente a esta problemática una alternativa viable puede ser el uso de bacterias termófilas nativas productoras de PHA, debido a que su rango de crecimiento suele estar por encima de los 45 °C, por lo tanto, estas temperaturas ayudan a mejorar el bioproceso manteniendo las condiciones de esterilidad y evitando problemas de contaminación por microorganismos ajenos (Chen y Jiang, 2018).

La Biotecnología Industrial de Próxima Generación (NGIB) pretende implementar una nueva industria bio sostenible para la producción de distintos biopolímeros entre ellos el PHA y resalta la importancia de estudiar bacterias extremófilas que puedan tolerar altas temperaturas, ambientes alcalinos o ácidos (Chen y Jiang, 2018). Por lo tanto, el empleo de bacterias termófilas cuyo rango de temperatura óptima de crecimiento esté entre 50–60 °C favorecería positivamente sobre los costos del bioproceso (Khatami *et al.*, 2021). Además, el uso de bacterias termófilas, hace que el bioproceso sea energéticamente eficiente debido a que el calor metabólico producido por ellas, prescinda de energía adicional para calentar el fermentador (Chen y Jiang, 2018), por ende, también se requiere menos cantidad de agua y energía para el enfriamiento, ya que el bioproceso se enfría con aire ambiental (Ibrahim, Willems y Steinbüchel, 2010).

Las bacterias termófilas con la capacidad de sintetizar PHA pueden habitar ambientes extremos como son las fuentes termales con temperaturas que van de 45 a más °C; entre estas bacterias se han reportado a *Caldimonas taiwanensis* que fue aislada de los manantiales de agua caliente en Taiwán (Sheu *et al.*, 2009); *C. thermostellatus* aislada de las fuentes termales de Egipto y productora de PHB a partir de glicerol y glucosa (Ibrahim,

Willems y Steinbüchel, 2010). Así mismo, en algunas fuentes termales de Japón se encontró *Thermus thermophilus* como potente productor de PHA y ramnolípidos utilizando glucosa como fuente de carbono (Pantazaki, Papaneophytou y Lambropoulou, 2011). En Cajamarca se han reportado 16 fuentes termales (Huamaní, 2000) las cuales albergan una gran diversidad de microorganismos termófilos con diferentes capacidades metabólicas sin explorar, dentro de estas resalta la fuente termal de Quilcate, ubicada en la provincia de San Miguel, la cual se encuentra en su estado natural; es decir, no se ha visto afectada por actividades antrópicas.

Ante lo expuesto anteriormente, el presente estudio se enfocó en evaluar la capacidad que tienen las bacterias provenientes de la fuente termal de Quilcate en la producción de PHA utilizando residuos de aceites de cocina, así como evaluar la influencia de diferentes temperaturas de incubación y distintas concentraciones del sustrato en la producción de dicho biopolímero. Para ello, se realizó un Screening de las bacterias provenientes de esta fuente termal con la capacidad de producir PHA, determinada mediante tinciones especiales para este biopolímero. A partir de estas se seleccionaron bacterias con capacidad de acumular de 75 a 100 % de gránulos de PHA en su interior citoplasmático; las que presentaron mayor rendimiento al finalizar los procesos fermentativos fueron evaluadas a diferentes temperaturas y concentraciones de sustrato; el rendimiento de producción de PHA fue estimado a partir de la relación que existía entre el peso seco de la biomasa y PHA.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

En un estudio realizado por Sangkharak *et al.* (2020), quienes evaluaron la capacidad que tiene *Bacillus thermoamylovorans* para producir PHA utilizando concentraciones de 2 y 4 % de ARC en un proceso fermentativo a una temperatura de 45 °C. Encontrándose que esta bacteria dio el máximo crecimiento celular ($4,0 \pm 0,2$ g/L) y una producción de PHA ($3,5 \pm 0,1$ g/L y 87,5% de DCW) a 45 °C utilizando 4% (p/v) de ARC. Por lo tanto, concluyeron que esta bacteria tiene la capacidad de acumular hasta un 87,5 % de PHA en su citoplasma con solo 4 % de ARC, afirmando que es una buena opción la producción de PHA por *B. thermoamylovorans* utilizando como única fuente de carbono ARC a una temperatura que convierte a la bacteria en termófila.

Kourilova *et al.* (2020), determinaron que la bacteria termófila *Schelegelella thermodepolymerans* DSM 15344 tiene un amplio potencial para producir $2,85 \pm 0,01$ g/L de PHA a partir de un medio básico de sal mineral utilizando 20 g/L de sustrato xilosa, así mismo, también tiene la capacidad de producir $1,67 \pm 0,02$ y $0,01 \pm 0,00$, de PHA utilizando glicerol y ARC, respectivamente. Como la producción de PHA fue mayor utilizando xilosa, optaron por evaluar cuál era el efecto de la variación en la temperatura (45, 50, 55 y 60 °C) por esta bacteria utilizando como fuente de carbono este sustrato. Determinaron que la mayor producción de PHA ($5,47 \pm 0,08$ g/L) por *S. thermodepolymerans* fue a una temperatura de 55 °C. Concluyendo que el empleo de bacterias termófilas es importante para la producción de PHA, ya que 55 °C es una temperatura lo suficientemente alta como para evitar la

contaminación masiva del proceso con microorganismos mesófilos y reducir el cuidado de esterilización del proceso.

Pernicova *et al.* (2019), realizaron un estudio con 9 aislamientos del género bacteriano *Halomonas* con el fin de determinar la capacidad de conversión de residuos aceitosos de frituras en gránulos de PHA; de las bacterias en estudio, *H. hydrothermalis* (obtenida de un respiradero hidrotermal de aguas profundas marinas), mostró ser la más prometedora en la producción de PHA, debido a que solo necesitaba una concentración de 40 g/L de NaCl y 20 g/L de ARC para acumular de manera óptima un 62 % de PHA en su citoplasma. Los investigadores concluyeron que *H. hydrothermalis* es una bacteria extremófila importante para la biotecnología industrial en lo que respecta a la producción de PHA utilizando ARC, siendo una de las primeras investigaciones que reportó la producción de PHA por *Halomonas* utilizando sustratos lipídicos.

En Perú existen escasos reportes de producción de PHA por bacterias aisladas de ambientes extremos, siendo una de las investigaciones más representativas la realizada por Flores, Idrogo y Carreño (2018), quienes obtuvieron 234 aislamientos de suelo y agua de las salinas de Mórrope, Lambayeque, empleando como medio de enriquecimiento HM1 (15 gL⁻¹ de glucosa) y como medio de producción de PHA el medio HM2 (30 gL⁻¹ de glucosa) a concentraciones de 15, 20 y 25 g/100 mL de NaCl, quienes concluyeron que 3 de sus aislamientos tuvieron óptima producción de PHA, de 60.73 %, 63.10 % y 72.52 %, respectivamente.

Guzmán *et al.* (2017), recolectaron 34 muestras de ocho salinas de los distritos de San José y Santa Rosa, Lambayeque, las cuales fueron enriquecidas en caldo HM1 con 1 g/L de glucosa a diferentes concentraciones de NaCl, de donde obtuvieron 203 aislamientos bacterianos que fueron aislados en agar HM1 y luego fueron cultivados en caldo HM2 con 10 g/L de glucosa como fuente de carbono, de donde solo seleccionaron 20 aislamientos por presentar una acumulación de 65-95 % de gránulos de PHA; estos aislamientos fueron llevados a un medio de fermentación utilizando almidón como fuente de carbono de donde se seleccionaron tres aislamientos con los valores más altos dentro de los cuales resaltó *Halomonas* sp. Por lo tanto, los investigadores concluyeron que *Halomonas* sp. sintetizó PHA con un rendimiento de 0,144 g.g⁻¹ utilizando 10 g/L de almidón, demostrando así que es factible la producción de PHA por bacterias halófilas nativas.

En una investigación realizada por Ibrahim, Willems y Steinbüchel (2010), a partir de una fuente termal en Egipto, encontraron 10 nuevas bacterias termófilas pertenecientes al género *Chelatococcus* productoras de PHA, de las cuales dos tuvieron una mayor acumulación de PHA del tipo poli-3HB de hasta un 73 % de su peso seco, a una temperatura de 50 °C, utilizando solo 2 % (v/v) de glicerol como única fuente carbono; en el caso de los otros aislamientos, utilizando glucosa, la producción de PHA fue menor. Dado que utilizando glicerol la producción de PHA fue mayor, concluyeron que los residuos lipídicos podrían ser una prometedora fuente de carbono.

2.2. Modelo conceptual

2.2.1. Fuentes termales

Una fuente termal es una descarga de agua caliente mayor a 35 – 45 °C, de un respiradero en la superficie de la Tierra y en algunas ocasiones la temperatura sobrepasa los 100 °C, están ubicadas geográficamente en todos los continentes del mundo, independientemente de la latitud y altitud que se encuentren, a excepción de la Antártida continental (Jones y Renaut, 2011). Las fuentes termales han sido investigadas a nivel mundial ya que poseen características fisicoquímicas que favorecen el desarrollo de diversos microorganismos termófilos (Chan *et al.*, 2015) los cuales son estudiados con el fin de determinar su filogenia, fisiología y ecología, ya que son considerados como un reservorio importante de nuevos genes, enzimas y moléculas que pueden brindar numerosas aplicaciones en diferentes campos de la biotecnología (Akanbi, Agyei y Saari, 2019).

El Perú cuenta con más de 500 fuentes termales distribuidas geográficamente en diferentes regiones, de las cuales existen escasos reportes sobre los microorganismos termófilos que las habitan. Espinal *et al.*, (2019); han reportado microorganismos termófilos que habitan la fuente termal de Candarave, Tacna, que presentan potencial biotecnológico. Haciendo un enfoque en nuestra región, Cajamarca según Huamaní (2000); es una las zonas geotérmicas más activas, donde se han reportado 16 fuentes termales dentro de las conocidas tenemos: Baños del Inca, Quilcate, El Almendral, Baños Jerez, Llanguat y Tragadero.

La fuente termal de Quilcate está ubicada en el distrito de Catillú, provincia de San Miguel, localizada a 78 ° 44' 24'' de longitud y 6 ° 49' 37'' de latitud, a una altitud de 3245 m.s.n.m. y cuenta con aguas termales que afloran en formas de manantiales clasificadas en el grupo Calipuy, el rango de temperatura de esta fuente se encuentra entre 51 y 62 °C con un pH casi neutro de 6.6 (Huamaní, 2000). Estas características fisicoquímicas inigualables hacen que esta fuente termal considerada como un ambiente extremo sea ideal para estudiar a los microorganismos termófilos que la habitan.

2.2.2. Bacterias termófilas y su potencial biotecnológico

Las bacterias termófilas son consideradas amantes del calor porque prosperan a temperaturas por encima de los 45 °C y se encuentran habitando fuentes termales, géiseres, sitios geográficos/geológicos extremos, incluyendo sitios volcánicos (Bhandari y Nailwal, 2020); la adaptación de estas bacterias en estos ambientes extremos ha ocasionado la evolución de sus complejos superficiales celulares, membranas citoplasmáticas, metabolitos intermediarios y enzimas metabólicas que las han ayudado a crecer y desarrollarse con normalidad en estos ambientes, y como resultado las bacterias termófilas se han convertido en un preciado reservorio de aplicaciones biotecnológicas (Salwan y Sharma, 2020).

Las bacterias termófilas presentan un variado potencial biotecnológico a nivel industrial a diferencia de las mesófilas ya que resisten las condiciones adversas de desnaturalización química, variaciones de pH, y sobre todo elevadas temperaturas, por ello, son consideradas excelentes productoras de enzimas,

biopolímeros, biocombustibles, biosurfactantes, entre otros (Chen y Jiang, 2018). Uno de los campos que ha captado interés a nivel industrial es la producción enzimática por bacterias termófilas, ya que las enzimas producidas por estas bacterias son más estables a altas temperaturas, como por ejemplo; la enzima taq ADN polimerasa que es obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y fue aislada de la fuente Termal Yellowstone, presenta la característica de ser estable a elevadas temperaturas, condición requerida en las técnicas de biología molecular (Debnath *et al.*, 2019).

Sin embargo, existen pocos informes sobre la producción de biopolímeros como los PHA por bacterias termófilas que respalden el amplio potencial biotecnológico que presentan al producir este biopolímero, por ejemplo, Ibrahim, Willems y Steinbüchel (2010), reportan la presencia de nuevas bacterias termófilas pertenecientes al género *Chelatococcus* en una fuente termal en Egipto, con la capacidad de almacenar PHA tipo poli-3HB hasta en un 73 % de su peso seco celular.

2.2.3. Polihidroxicanoatos (PHA)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros naturales almacenados como inclusiones citoplasmáticas esféricas en forma de gránulos redondos que llegan a ocupar hasta el 90 % del peso seco de algunos microorganismos y miden de $0,2 \pm 0,5$ mm, son producidos cuando existe un desequilibrio en sus nutrientes; es decir, tienen una excesiva fuente de carbono; pero, deficientes nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y oxígeno. Actualmente se han registrado más de 300 bacterias y una amplia gama de arqueas productoras de

hasta 150 tipos diferentes de PHA con diferentes propiedades fisicoquímicas de acuerdo a su composición monomérica (Li y Wilkins, 2020).

2.2.3.1. Clasificación y tipos de PHA

De acuerdo con la estructura química de los PHA estos están formados por unidades monoméricas de ácidos grasos (R)-hidroxi, unidos por enlaces ésteres y cada unidad monomérica consta un grupo R de cadena lateral tal como se muestra en la figura 1. (Sharma, Sehgal y Gupta, 2021), los radicales R hacen posible numerosas combinaciones de estos biopolímeros, así mismo sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas están dadas por estas (Albuquerque y Malafaia, 2018).

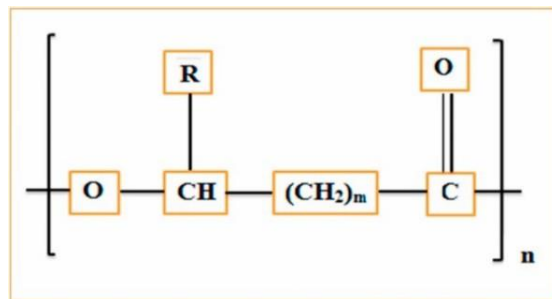


Figura 1. Estructura básica de los PHA (Sharma, Sehgal y Gupta, 2021).

Se clasifican en diferentes tipos según la longitud de su cadena estructural como los: PHA de cadena corta (scl-PHA) que están compuestos de 3-5 carbonos y dentro de los más representativos los 3-hidroxi butirato (3HB), 3-hidroxi valeato (3HV) y 4-hidroxi butirato (4HB); sin embargo, no son tan atractivos para aplicaciones biomédicas o embalaje debido a sus propiedades mecánicas ya que son rígidos y quebradizos, a diferencia de los PHA de cadena mediana (mcl-PHA) y larga (lcl-PHA) como los 3-hidroxi octanoato (PHO) y

poli (3-hidroxipentadecanoico) que están compuestos de 6-14 carbonos a más, y son materiales que presentan una alta flexibilidad y reducida cristalinidad (Albuquerque y Malafaia, 2018; Koller, 2021)

2.2.3.2. Vías de síntesis de PHA

La producción de PHA se da principalmente por tres vías metabólicas (Sharma, Sehgal y Gupta, 2021). Estas vías metabólicas son importantes; ya que, de acuerdo con la fuente de carbono suministrada y la vía de síntesis del microorganismo que asimile dicha fuente, se determina el tipo de PHA junto con sus propiedades mecánicas y físicas (Adeleye *et al.*, 2020).

La vía de síntesis clásica para la producción de scl-PHA a partir de azúcares, ácidos grasos o aminoácidos es la Vía Acetil-CoA a 3-hidroxybutyryl-CoA o Vía 1 que tienen una scl-PHA sintasa (PhaC_{scl}) específica para sustratos de C3–C5 (Chen *et al.*, 2015); la bacteria más representativa es *Cupriavidus necator* (Haywood, Anderson y Dawes, 1989). Otra de las vías es la β - oxidación donde la sintasa mcl-PHA (PhaC_{mcl}) es la precursora de los ácidos grasos (Adeleye *et al.*, 2020); que es la fuente de carbono que utilizaremos en este estudio, ya que esta vía es la adecuada para producción de PHA del tipo mcl-PHA que presenta mejores características mecánicas y fisicoquímicas, dentro de las bacterias más representativas que utilizan esta vía tenemos a *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* y *P. aeruginosa* (Sudesh, Abe y Doi, 2000). En el caso de la vía de síntesis 3 también es de importancia

debido a que los microorganismos productores de PHA utilizan fuentes de carbono simples y baratas como aguas residuales, lodos activados, grasas animales, hidrocarburos, etc.(Adeleye *et al.*, 2020; Sharma, Sehgal y Gupta, 2021).

2.2.3.3. Factores que afectan la producción de PHA

Fuente de carbono

Es uno de los factores más importantes a considerar en la producción de PHA, debido a que determinan el tipo, composición y características mecánicas del PHA producido dependiendo del tipo de vía metabólica precursora de la fuente de carbono que asimile el microorganismo (Rodríguez-Perez *et al.*, 2018). Las fuentes de carbono más estudiadas para la producción de PHA tenemos a los residuos ricos en azúcares como glucosa, sacarosa, fructosa, y, los residuos lipídicos con un alto contenido en ácidos grasos como miréticos, palmíticos, esteáricos, oleicos, y butíricos. (Rodríguez-Perez *et al.*, 2018; Khatami *et al.*, 2021).

Temperatura

La temperatura es uno de los puntos críticos para la producción PHA, de acuerdo con diversas investigaciones los rangos de temperatura utilizados por microorganismos mesófilos van de 30 a 37 °C, a diferencia de los microorganismos termófilos que su rango de producción óptima reportada está dentro de 45 a 55 °C, razón por la cual estos microorganismos son de gran utilidad gracias a su tolerancia

a las altas temperatura que ayudan a reducir las condiciones de esterilidad de estos procesos (Lim *et al.*, 2003). Una de las investigaciones realizada por Ibrahim, Willems y Steinbüchel (2010), en una fuente termal en Egipto, reportaron la producción de un 73 % de PHA por bacterias termófilas pertenecientes al género *Chelatococcus* a una temperatura de 50 °C utilizando como fuente de carbono glicerol.

Fuente de nitrógeno (N)

La fuente de nitrógeno es otro factor importante en la producción de PHA, ya que, esta fuente de N a una alta concentración en el medio de fermentación ayuda en la fase de crecimiento de la bacteria al inicio de todo proceso fermentativo (Tu *et al.*, 2019), no obstante, si existe una limitación de N después de la etapa de crecimiento, se disminuye la síntesis de proteínas microbianas para el crecimiento bacterias y da como resultado mayor producción de PHA ya que las bacterias han sido sometidas a condiciones estresantes donde luchan por su supervivencia; por ende, el biopolímero viene a ser el producto principal de estas bacterias (Wen *et al.*, 2010).

pH

El pH también influye directamente en la tasa de producción como en la composición química del PHA; por ende, debe ser considerado en los pasos de enriquecimientos y acumulación del biopolímero (Khatami *et al.*, 2021); el rango de pH en la etapa de enriquecimiento

para bacterias mesófilas se encuentra dentro 5,5–9,0 (Padan *et al.*, 2005); en cambio para la acumulación de este polímero el pH óptimo es de 7.5-8.5 (Villano *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios realizados sin tomar en cuenta el pH por bacterias extremófilas han mostrado resultados favorables para la producción de PHA, ya que el proceso se vuelve menos complicado y reduce costos (Khatami *et al.*, 2021).

2.2.3.4. Producción de PHA por bacterias

Durante los últimos años se han descrito una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas con capacidad para acumular diferentes tipos de PHA (Albuquerque y Malafaia, 2018), las cuales según Khanna y Srivastava (2005), se pueden dividir en dos grupos: bacterias que requieren una excesiva fuente de carbono y limitante de nutrientes esenciales (nitrógeno, oxígeno, fósforo, magnesio o azufre), donde tenemos a *C. necator*, *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* y *P. oleovorans*, sin embargo, las bacterias clasificadas en el segundo grupo no requieren limitación de nutrientes para sintetizar PHA, ya que han sido modificadas genéticamente y dentro de ellas tenemos a *Escherichia coli* recombinante o inducidas a mutaciones como *A. latus*, y *Azotobacter vinelandii*.

La NGIB, en busca de una nueva industria bio sostenible para la producción de PHA, resalta la importancia de utilizar bacterias aisladas de ambientes extremos (Chen y Jiang, 2018). Por ejemplo, se

han reportado diferentes bacterias termófilas productoras de PHA como; *Caldimonas taiwanensis* que fue aislada de los manantiales de agua caliente en Taiwán (Sheu *et al.*, 2009); *C. thermostellatus*, aislada de una fuente termal de Egipto, como productora de PHB utilizando glicerol y glucosa (Ibrahim, Willems y Steinbüchel, 2010); *Pseudomonas* sp. SG4502 reportada como productora de mcl-PHA a 55 °C (Sato *et al.*, 2011); así mismo de una fuente termal de Japón se aisló a *Thermus thermophiles* CHB8 como potente productor de PHA y ramnolípidos a la vez utilizando como fuente de carbono glucosa (Pantazaki, Papanephytou y Lambropoulou, 2011). Por eso, los ambientes extremos como las fuentes termales se han convertido en los reservorios ideales para aislar y estudiar bacterias productoras de PHA, debido a los escasos reportes y alta demanda de bacterias resistentes a condiciones adversas de su ambiente.

2.2.4. Potenciales fuentes de carbono reutilizables para producir PHA

Las bacterias cuentan con tres vías metabólicas para la síntesis de PHA, lo que hace que presenten una mayor capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono como: residuos agroindustriales, municipales, domésticos, material de desecho agrícolas, grasas y aceites, materias primas lignocelulósicas, almidonadas y azúcares (Adeleye *et al.*, 2020). Por lo tanto, a continuación, describiremos a las potenciales fuentes de carbono reutilizables utilizadas para mejorar la producción de PHA.

Residuos orgánicos ricos en lípidos

Los residuos de aceites vegetales podrían considerarse como una fuente eficiente para la producción de PHA en comparación con otros sustratos, ya que la tasa de producción de PHA es 0,6 – 0,8 g/g utilizando aceite residual, mientras que con fuentes ricas en azúcares es solo de 0,3–0,4 g/g (Chee *et al.*, 2010); por lo tanto, se convierten en una opción viable para disminuir los gastos de producción; además, no necesitan ningún tratamiento previo para ser utilizados ya que durante el proceso de fritura los aceites pasan por numerosas reacciones químicas a altas temperaturas, como, hidrólisis, oxidación térmica y polimerización, razón por la cual pueden utilizarse directamente sin ningún tratamiento previo en la producción de PHA. Dentro de las bacterias más estudiadas y con mejor rendimiento en producción de PHA utilizando estos residuos tenemos a *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Halomonas* y *Bacillus* sp. (Ganesh *et al.*, 2021).

Sin embargo, los residuos de la industria del biodiesel también son considerados como una fuente de carbono para la síntesis de PHA, además el uso de estos residuos podrían ser una vía de apoyo para compensar el gasto de la producción de biodiesel (Ganesh *et al.*, 2021); por tal motivo, *C. necator* ha sido ampliamente estudiada para la utilización directa de glicerol comercial y glicerol crudo de biodiesel para la síntesis de PHA, donde obtuvieron una máxima degradación de 82,5 g/L y 68,8 g/L, y una acumulación de PHB de 62 % (Cavalheiro *et al.*, 2012). Otro de los residuos que podrían utilizar son los desperdicios de grasas animales por el alto contenido de ácidos grasos que contiene; sin embargo, necesitan un previo tratamiento para ser utilizadas por

eso no han sido muy estudiadas (Ganesh *et al.*, 2021).

Residuos de la industria láctea (suero de leche)

El suero de leche es un residuo acuoso que está compuesto por lactosa, proteínas y ácido láctico, y que para ser utilizado eficazmente por bacterias productoras de PHA necesita un pretratamiento químico para convertir la lactosa en glucosa (fuente de carbono precursora de la Vía de síntesis de producción de PHA) y galactosa, generando un costo adicional en el proceso (Ganesh *et al.*, 2021). Pese a ello, existen investigaciones como la de Nath *et al.* (2008), que reportan un 67 % de acumulación de PHB por *Methylobacterium* sp. utilizando suero de leche como fuente de carbono, razón por la cual se busca superar el pretratamiento para que pueda considerarse como un sustrato eficaz y eficiente.

Residuos de la industria azucarera (melaza)

La melaza al igual que el suero de leche necesita un pretratamiento para ser utilizado en la producción de PHA, ya que la composición química de la melaza es en mayor cantidad sacarosa que glucosa y fructosa; por ende, es necesario convertir estos azúcares primero para que puedan ser utilizados e inclusive se debe eliminar los contaminantes, como polifenoles y sales inorgánicas, que podrían limitar el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, debido a su abundante disponibilidad en las industrias azucareras, está siendo ampliamente estudiado ya que también presentan porcentajes importantes de producción de PHA (Ganesh *et al.*, 2021).

2.2.5. Métodos de extracción de PHA

El método de extracción con disolventes es el más utilizado para recuperación de PHA, mediante este método se altera la permeabilidad de la membrana celular y se disuelve solo el polímero almacenado en el interior bacteriano, dentro de ellos tenemos a los disolventes halogenados como el cloroformo, cloruro de cloruro de metileno y algunos productos químicos como el hidróxido de potasio y sodio, hipoclorito de sodio o ácido sulfúrico que son ideales para la recuperación de PHA, sin embargo, algunos de estos son nocivos y la exposición a estos puede ocasionar problemas de salud, es por ello que se han propuesto disolventes verdes como el carbonato dimetil (DMC) y disolventes bio, para reducir en cierta forma los efectos negativos de estos componentes (Pérez, López y Roy, 2019).

El uso de tensioactivos como el dodecilo sódico aniónico (SDS) y enzimas como las proteasas, nucleasas, fosfolipasas y lisozimas, es otra manera de recuperar PHA, ya que, ingresan en la membrana lipídica y aumenta el volumen celular hasta que estallan y al final estos tensioactivos junto con los fosfolípidos forman micelas y permiten la liberación de los gránulos de PHA, sin embargo, también existen otros métodos más sofisticados de interrupción mecánica como el empleo de molino de cuentas, y ultrasonidos para la obtención de PHA (Pérez, López y Roy, 2019).

2.2.6. Aplicaciones de los PHA

Los PHA actualmente presentan numerosas aplicaciones al ser de naturaleza biodegradable y no necesitar tratamientos para ser eliminados del ambiente, razón por la cual han sido formulados como bioplásticos para ser utilizados en la industria del empaquetado de alimentos o productos con envases desechables, sin embargo, actualmente, los PHA han ido abarcando el campo biomédico, farmacéutico, agrícola, alimentación animal, biocombustibles, impresión 3D y usos de materiales inteligentes, debido a las diferentes formulaciones de estos, lo cual los hace más atractivos y novedosos (Kalia *et al.*, 2021).

En el campo biomédico es donde más están siendo estudiados por su biocompatibilidad y resistencia excepcional que les permite conservarse por períodos de tiempo prolongados en el cuerpo humano, es por lo que se han fabricado dispositivos médicos reabsorbibles como andamios, microesferas, matrices porosas, suturas quirúrgicas o transportadores de fármacos potentes, además, también son utilizados en la ingeniería de tejidos como andamios porosos y parches que ayudan en la regeneración de órganos, tejidos intestinales, cardíacos, vasculares, óseos y neuronales (Kalia *et al.*, 2021).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de investigación

Nivel explicativo.

3.2. Tipo y diseño de la investigación

Investigación de tipo básica y con diseño cuasi experimental.

3.3. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por 106 aislamientos bacterianos que fueron obtenidos de sedimento, tapete microbiano y biopelícula de la fuente termal de Quilcate (55 °C), provincia de San Miguel, Cajamarca, que están conservados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.4. Unidad de análisis

Aislamiento bacteriano cultivable proveniente de la fuente termal de Quilcate conservados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca con capacidad productiva de PHA.

3.4.1 Procedimientos

Aislamiento bacteriano cultivable proveniente de la fuente termal de Quilcate conservados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca con capacidad productiva de PHA.

3.4.1.1. Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA

Fuente de carbono

Se utilizó como fuente de carbono aceite residual de cocina (ARC) obtenido de una pollería de la ciudad de Cajamarca después del proceso de fritura de papas. El ARC fue filtrado para luego ser esterilizado por separado en autoclave a 121 °C (Apéndice 1).

Screening de la producción de PHA mediante tinciones

Los 106 aislamientos bacterianos fueron reactivados en Agar Nutritivo a 45 °C durante 24 - 72 h (de acuerdo con el crecimiento bacteriano), luego se inoculó en tubos que contenían 5 mL de caldo PHA modificado (Apéndice 2), cuyos componentes fueron: 20 g/L de ARC, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13 g/L de KH_2PO_4 , 1.2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7 g/L de ácido cítrico; además, se adicionó 10 mL/L de agua de la fuente termal (conteniendo elementos traza). Luego, el medio fue autoclavado por 15 min a una temperatura de 121 °C y 1 atmósfera de presión, el pH se ajustó a 7 (Spiekermann *et al.*, 1999). Los tubos de cultivo fueron colocados en un shaker con baño maría a 45 °C por 96 h a 150 rpm.

De cada cultivo en el medio modificado para la detección de PHA, se tomó 1 mL en tubos eppendorf que fueron centrifugados por 10 min a 5000 rpm; el pellet obtenido se utilizó para observar los gránulos de

PHA mediante microscopía óptica con tinción Negro Sudán B según lo mencionado por Hartman (1940), y microscopía de fluorescencia con tinción Azul Nilo (Apéndice 2) de acuerdo con la metodología descrita por Ostle y Holt (1982) (Anexo 1). Después de realizadas las observaciones microscópicas y de fluorescencia, se seleccionaron solo siete aislamientos teniendo en cuenta que la proporción del citoplasma bacteriano ocupado por los gránulos de PHA fuera mayor a 75-100 %.

Perfil bioquímico de las bacterias productoras de PHA

Se realizó la caracterización bioquímica a los siete aislamientos seleccionados en el procedimiento anterior a través de las siguientes pruebas: fermentación de glucosa en agar tres azúcares hierro (TSI); descarboxilación de la lisina en el medio agar lisina hierro (LIA); capacidad de las bacterias de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono en citrato de Simons, en el medio SIM se observó la motilidad bacteriana, mientras que la producción de ácidos mixtos o de compuestos neutros a partir de glucosa se determinó en el caldo rojo de metilo – Voges Proskauer (RM-VP). También se realizó las pruebas de catalasa y oxidasa.

3.4.1.2. Screening de la producción cuantitativa de PHA

Los siete aislamientos seleccionados se reactivaron en agar Nutritivo y fueron incubados a 45 °C durante 24 h, estos cultivos jóvenes fueron inoculados en frascos de vidrio que contenían 25 mL de caldo nutritivo cuya composición fue: 10 g/L de extracto de levadura y 20

g/L de ARC. Los cultivos se incubaron a 45 °C por 24 h a 180 rpm (hasta una concentración aproximada de 1×10^7 células/ml), luego fue centrifugado a 3500 rpm durante 10 min, bajo condiciones de esterilidad, con la finalidad de obtener la biomasa que constituirían los inóculos bacterianos a emplear en los ensayos siguientes (Apéndice 3).

La biomasa obtenida fue añadida a un frasco de vidrio que contenía 250 mL de medio mineral de fermentación cuyos componentes fueron: 20 g/L de ARC, 0.1 g/L de extracto de levadura, 1.0 g/L de NH_4Cl , 0.5 g/L de NaHCO_3 , 1.0 g/L de K_2HPO_4 , 2.0 g/L de KH_2PO_4 , 2.0 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L de citrato de $\text{Fe}(\text{NH}_4)$; además, se adicionó 5.0 mL de solución traza que contuvo: 0.08 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L de H_3BO_3 , 0.2 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a un pH de 7.0. Los procesos de fermentación se realizaron por triplicado y fueron incubados a 45 °C, 180 rpm por 72 h (Haba *et al.*, 2007).

Al término del proceso fermentativo se separó la biomasa por centrifugación a 3500 rpm durante 10 min; la biomasa se lavó con agua destilada y se volvió a centrifugar bajo las condiciones anteriormente mencionadas, hasta por tres veces. Posteriormente se secó la biomasa a 50° C por 24 h o hasta que se obtuviera un peso constante.

Finalmente, la biomasa obtenida se utilizó para extraer PHA por el método hipoclorito – cloroformo según Hahn *et al.* (1994), descrito en el anexo 2, apéndice 2.

La cantidad de PHA producido se determinó a través del índice de rendimiento $Y_{(P/X)}$ (ecuación 1), que relaciona el peso seco del PHA y el peso seco de la biomasa en g/L.

$$\text{Ecuación 1: } Y_{(P/X)} = \frac{\Delta P}{\Delta X}$$

Donde:

ΔP : Peso seco de PHA en g/L.

ΔX : Peso seco de la biomasa en g/L.

Del proceso de Screening se seleccionaron los dos aislamientos con mayor rendimiento para evaluar el efecto de la variación de temperatura en la producción de PHA.

3.4.1.3.Efecto de la variación de temperatura y concentración de residuos aceitosos en la producción de PHA

Los procedimientos descritos a continuación fueron aplicados solamente a las bacterias que presentaron los mayores rendimientos de producción de PHA.

Evaluación de la variación de la temperatura

El proceso de fermentación se realizó bajo las condiciones anteriormente mencionadas, con una concentración constante de sustrato del 2 % de ARC, y con una variación en la temperatura de incubación de 45, 50 y 55 °C. Finalmente, se evaluó el rendimiento para cada temperatura anteriormente descrita (Apéndice 4).

Evaluación de la variación de la concentración de residuos aceitosos

Los mismos aislamientos seleccionados se emplearon para evaluar el efecto de la variación del sustrato en la producción de PHA. El proceso de fermentación se realizó bajo las condiciones anteriormente mencionadas a la temperatura de 50 °C, correspondiente al mayor rendimiento en el paso anterior, y con una variación en la concentración de sustrato de 2 %, 4 % y 6 % de ARC. Finalmente, se evaluó el rendimiento para cada concentración (Apéndice 4).

3.4.1.4. Procesamiento y análisis de datos

Todos los datos obtenidos durante los experimentos fueron anotados en hojas de recolección de datos. Al finalizar los experimentos todos los datos fueron vaciados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel para Windows 10 donde fueron procesados y categorizados antes de exportarlos al programa estadístico SPSS v23 (2014).

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS v23 (2014), con el que se compararon los promedios de biomasa, producción de PHA y rendimiento según las temperaturas y concentración de sustrato empleadas aplicándose la prueba estadística no paramétrica Kruskal - Wallis, con un nivel de confianza de 95 % y un $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA

Screening de la producción de PHA mediante tinciones

De los 106 aislamientos bacterianos procedentes de la fuente termal de Quilcate y criopreservados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, se realizó un Screening utilizando caldo PHA modificado, medio específico que permitió la producción de gránulos de PHA en el citoplasma de las bacterias en estudio. En la Tabla 1 se muestran el total de aislamientos bacterianos evaluados agrupados según la proporción de los gránulos de PHA observados con la tinción Negro Sudán B.

Tabla 1. Producción de PHA a través de tinción Negro Sudán B de los 106 aislamientos bacterianos en estudio.

Proporción de citoplasma bacteriano ocupado por los gránulos de PHA	Cantidad de aislamientos bacterianos evaluados	%
(-) ^a	18	17
(+) ^b	23	22
(++) ^c	23	22
(+++) ^d	41	38
No creció	1	1
Total	106	100

^a Ausencia de gránulos en el citoplasma.

^b (1-34 %).

^c (35-74 %).

^d (75-100 %).

De acuerdo con las observaciones microscópicas de la tinción Negro Sudán B realizada a los 106 aislamientos bacterianos, el 82 % tienen la capacidad de acumular PHA; sin embargo, solo el 39 % acumulan el biopolímero en casi todo el interior de su citoplasma bacteriano (75-100 % de gránulos de PHA), como se observa en la figura 2. No obstante, el 17 % de los aislamientos bacterianos evaluados en este estudio no evidenciaron gránulos de PHA bajo las condiciones de cultivo dadas (45 °C y 2 % ARC).

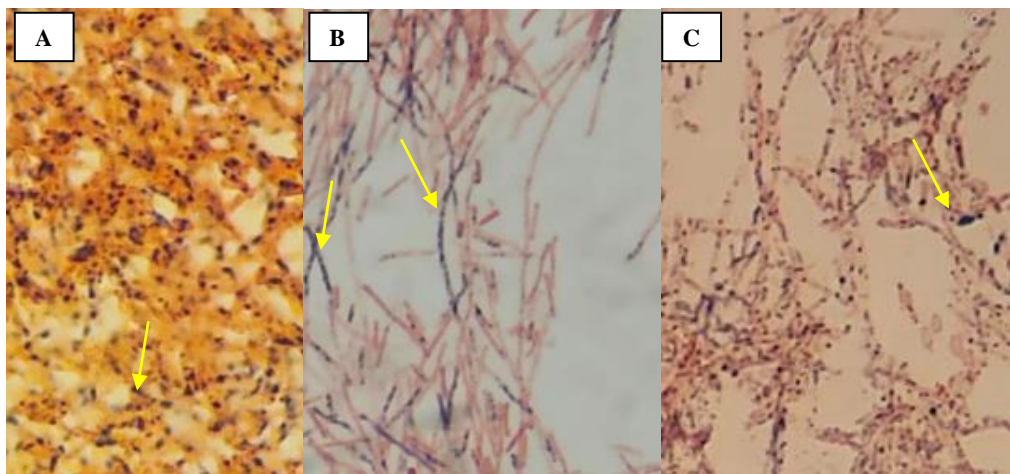


Figura 2. Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B realizada a los aislamientos bacterianos a 100X **A)** *Aneuribacillus thermoaerophilus* Q60 **B)** *Brevibacillus* sp. Q8 **C)** *A. thermoaerophilus* Q31. Las flechas amarillas señalan los gránulos de PHA.

En la figura 2 se observa que los gránulos de PHA están teñidos de color negro debido que el colorante Negro Sudán B es hidrofóbico y tiene afinidad por los fosfolípidos presentes en la monocapa que rodea la estructura de estas inclusiones citoplasmáticas, los cuales se encuentran en el citoplasma bacteriano.

Así mismo, los frotis con tinción Azul Nilo y observados con microscopía de fluorescencia mostraron que estos gránulos emitían un color anaranjado brillante al ser expuesto al espectro de luz azul de 460 nm, tal como se muestra en la Figura 3.

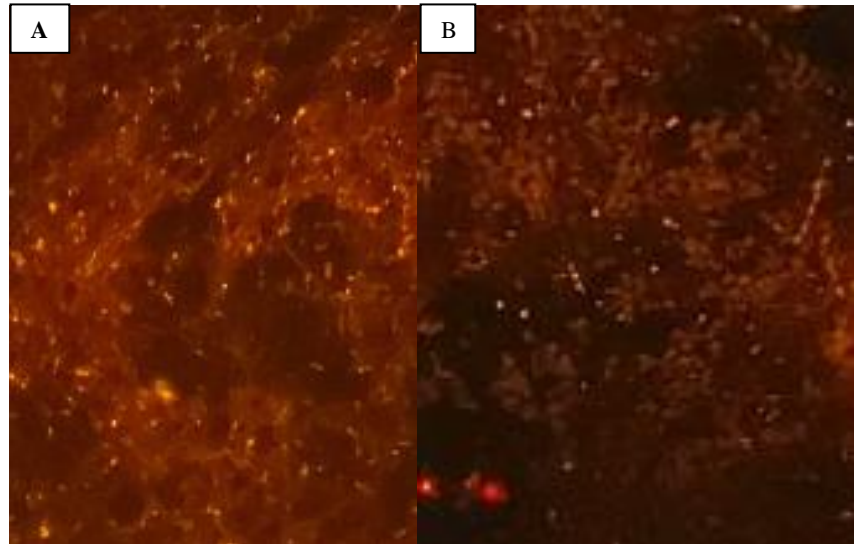


Figura 3. Observación por microscopía de fluorescencia con tinción Azul Nilo de las bacterias evaluadas a 100X. **A)** *Brevibacillus* sp. Q8. **B)** *Anoxybacillus salavatliensis* Q15.

Perfil bioquímico de los aislamientos bacterianos productores de PHA

De los 41 aislamientos bacterianos que evidenciaron mayor acumulación de gránulos de PHA en su interior citoplasmático, se seleccionaron siete de estos; en la tabla 2 se describen sus características microbiológicas. Todos los aislamientos bacterianos seleccionados con mayor producción de PHA, son bacilos Gram +, formadores de spora, fermentadores de glucosa. Solo uno de los 7 presentó movilidad y fue oxidasa negativa (Q15).

Tabla 2. Caracterización microbiológica de los siete aislamientos bacterianos que evidenciaron mayor acumulación de gránulos de PHA en su citoplasma.

Aislamiento bacteriano	Características microbiológicas													
	Morfología	Gram	Espora	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Citrato	Descarboxilación de la lisina	Movilidad	Indol	MR	VP	Catalasa	Oxidasa
<i>Brevibacillus</i> sp. Q8	b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. thermoaerophilus</i> Q9	b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>A. salavatliensis</i> Q15	b	+	+	+	-	-	-	NC	+	-	+	-	+	-
<i>B. licheniformis</i> Q25	b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. thermoaerophilus</i> Q31	b	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>A. thermoaerophilus</i> Q60	b	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. licheniformis</i> Q75	b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

MR: Prueba de Rojo de metilo; VP: prueba de Voges-Proskauer; b: bacilo; (+) Positivo; (-) Negativo; NC: No creció.

4.1.2. Screening de la producción cuantitativa de PHA

Producción cuantitativa de PHA por aislamientos bacterianos

En la tabla 3 se reporta los rendimientos obtenidos en g/L de la producción de PHA de los 7 aislamientos bacterianos seleccionados, donde *B. licheniformis* Q25 tuvo el mayor porcentaje de producción de PHA con 52.72 ± 0.03 %. Además, *A. thermoaerophilus* Q60 evidenció el segundo mayor porcentaje de producción PHA con 45.72 ± 0.03 %. Ambos aislamientos presentaron los rendimientos más altos en comparación con el resto de los aislamientos que produjeron PHA por debajo del 30 % del peso celular seco (DCW) de la bacteria.

Tabla 3. Producción de PHA por los 7 aislamientos bacterianos, utilizando ARC al 2 % como fuente de carbono (72 h, 45 °C, 150 rpm).

Aislamiento	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento PHA [%] ³
<i>Brevibacillus</i> sp. Q8	0.1596 ± 0.01	0.0270 ± 0.00	16.90 ± 0.09 ^b
<i>A. thermoaerophilus</i> Q9	0.2307 ± 0.02	0.0368 ± 0.00	15.95 ± 0.14 ^b
<i>A. salavatliensis</i> Q15	0.1252 ± 0.01	0.0272 ± 0.00	21.73 ± 0.07 ^b
<i>B. licheniformis</i> Q25	0.0927 ± 0.01	0.0489 ± 0.01	52.72 ± 0.03 ^a
<i>A. thermoaerophilus</i> Q31	0.2180 ± 0.00	0.0406 ± 0.00	18.61 ± 0.13 ^b
<i>A. thermoaerophilus</i> Q60	0.0676 ± 0.01	0.0309 ± 0.00	45.72 ± 0.03 ^a
<i>B. licheniformis</i> Q75	0.2349 ± 0.02	0.0691 ± 0.01	29.43 ± 0.12 ^b

Prueba de Kruskal-Wallis (*p*-valor): ¹ 0.011; ² 0.010; ³ 0.007; a,b: letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en las pruebas bilaterales.

La figura 4 muestra la biomasa, producción de PHA en g/L y el rendimiento en % de DCW obtenido de las bacterias evaluadas, se puede observar que la producción de PHA con la cantidad de biomasa microbiana producida no se correlaciona; es decir, hubo bacterias con mayor producción de biomasa, pero poca producción de PHA. Los aislamientos *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60 presentaron un mayor rendimiento de PHA de 52,72 % y 45,72 % respectivamente, pese a presentar poca biomasa a diferencia de lo que ocurre con los demás.

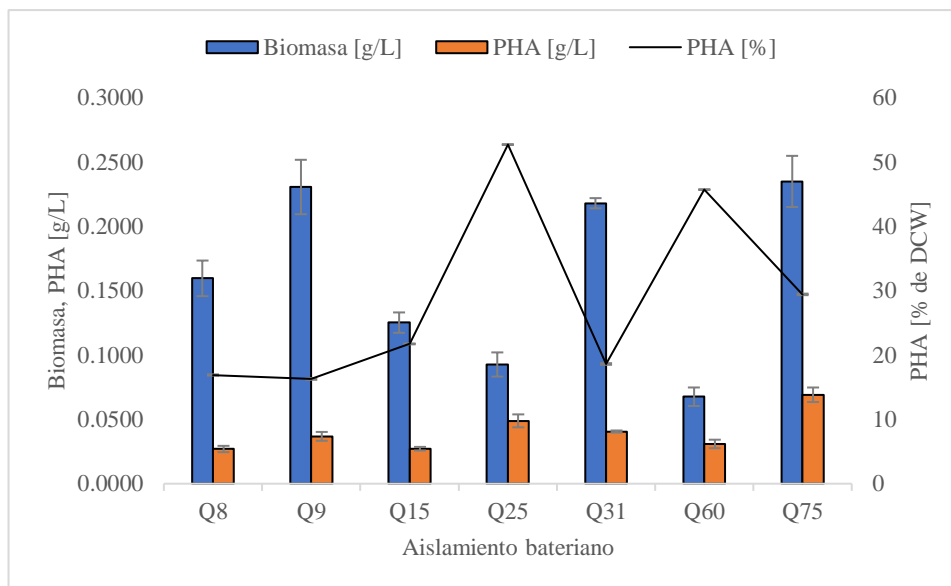


Figura 4. Producción de PHA obtenido de los 7 aislamientos seleccionados a 2 % de ARC, 45 °C, 150 rpm por 72 h de crecimiento.

4.1.3 Efecto de la variación de temperatura y concentración de residuos aceitosos en la producción de PHA

La variación de temperatura de incubación en *B. licheniformis* Q25, tuvo un efecto positivo sobre esta bacteria, ya que, a 50 °C produjo 57.80 ± 0.02 % de PHA, siendo aproximadamente un 5 % más que el que se obtuvo a 45 °C; sin embargo, a 55 °C la bacteria disminuyó su producción en un 23 % y de acuerdo con la tinción Negro Sudán B realizada se evidenció mayor presencia de esporas; según Mohapatra *et al.* (2017), esto se debe a la naturaleza esporulante que presentan las especies de *Bacillus* cuando son sometidas a condiciones de estrés (como la incubación a 55 °C), justificando así la poca biomasa obtenida y por consiguiente también la menor producción de PHA, como se reporta en la tabla 4 y figura 5.

Tabla 4. Producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 utilizando ARC al 2 % como fuente de carbono a diferentes temperaturas (72 h, 150 rpm).

Aislamiento	T [°C]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ¹	Rendimiento de PHA [%] ¹
<i>B. licheniformis</i> Q25	45	0.0978 ± 0.00	0.0516 ± 0.00	52.76 ± 0.03
	50	0.0654 ± 0.02	0.0378 ± 0.01	57.80 ± 0.02
	55	0.0254 ± 0.00	0.0090 ± 0.00	35.35 ± 0.01

Prueba de Kruskal-Wallis (*p*-valor): ¹0.102.

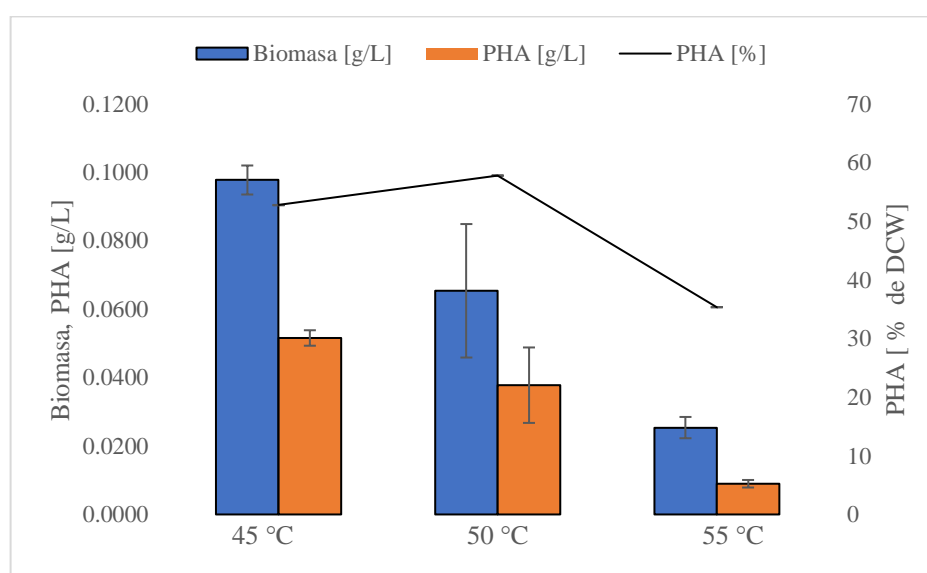


Figura 5. Producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 a diferentes temperaturas y 2% de ARC, 72 h,150 rpm.

Como a 50 °C se registró una mayor producción de PHA por *B. licheniformis* Q25, se tomó esa temperatura como referencia para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de ARC. La concentración de sustrato al 2 % fue la que mejor rendimiento produjo para este aislamiento bacteriano, con 0.0654 ± 0.02 g/L de biomasa obtenida se obtuvo 0.0378 ± 0.01 g/L de PHA, siendo 50 % mayor el PHA producido en comparación con las otras concentraciones.

Tabla 5. Producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 utilizando diferentes concentraciones de ARC a 50 °C ,72 h, 150 rpm.

Aislamiento	AR C [%]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ¹	Rendimiento de PHA [%] ¹
<i>B. licheniformis</i> Q25	2	0.0654 ± 0.02	0.0378 ± 0.01	57.80 ± 0.02
	4	0.0336 ± 0.00	0.0090 ± 0.00	26.79 ± 0.02
	6	0.0244 ± 0.00	0.0102 ± 0.00	41.80 ± 0.01

Prueba de Kruskal-Wallis (*p*-valor): ¹ 0.102.

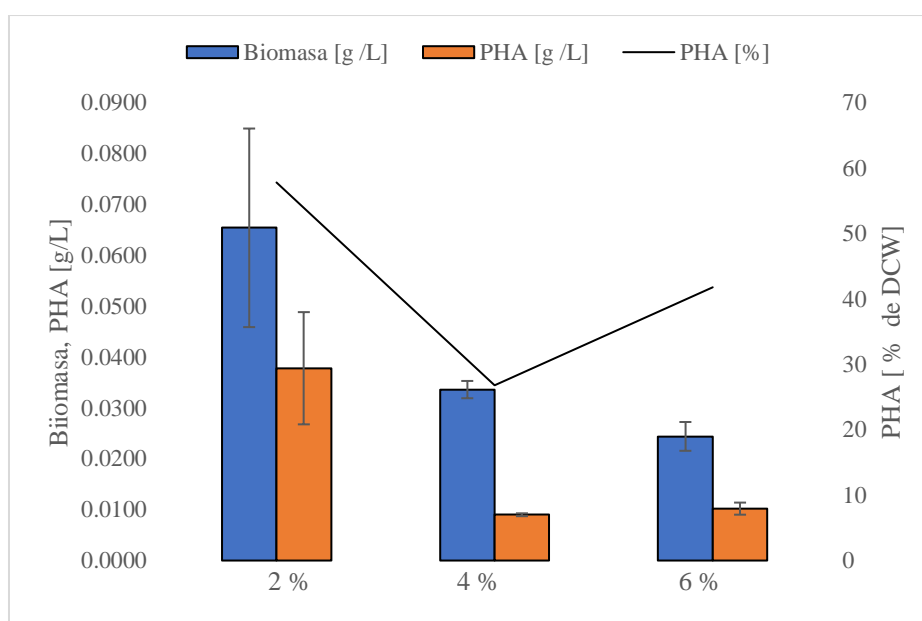


Figura 6. Producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 a diferentes concentraciones de ARC, 50 °C, 72 h, 150 rpm.

En *A. thermoaerophilus* Q60 también se evidenció mayor producción de PHA a 50 °C (54.61 ± 0.03 %), como se observa en la tabla 6 y figura 7, no obstante, a 55 °C el rendimiento para este aislamiento bacteriano fue similar al producido a 50 °C (53.20 ± 0.02 %). Por lo tanto, se podría inferir que la mejor producción de PHA utilizando 2 % de ARC para este aislamiento bacteriano se encontraría entre 50 – 55 °C.

Tabla 6. Producción de PHA por *A. thermoaerophilus* Q60 utilizando ARC al 2 % como fuente de carbono a diferentes temperaturas (72 h, 150 rpm).

Aislamiento	T [°C]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento de PHA [%] ³
<i>A. thermoaerophilus</i> Q60	45	0.0712 ± 0.01	0.0326 ± 0.00	45.73 ± 0.03
	50	0.1084 ± 0.00	0.0592 ± 0.00	54.61 ± 0.03
	55	0.0732 ± 0.01	0.0389 ± 0.01	53.20 ± 0.02

Prueba de Kruskal-Wallis (*p*-valor): ¹ 0.156; ² 0.180; ³ 0.102.

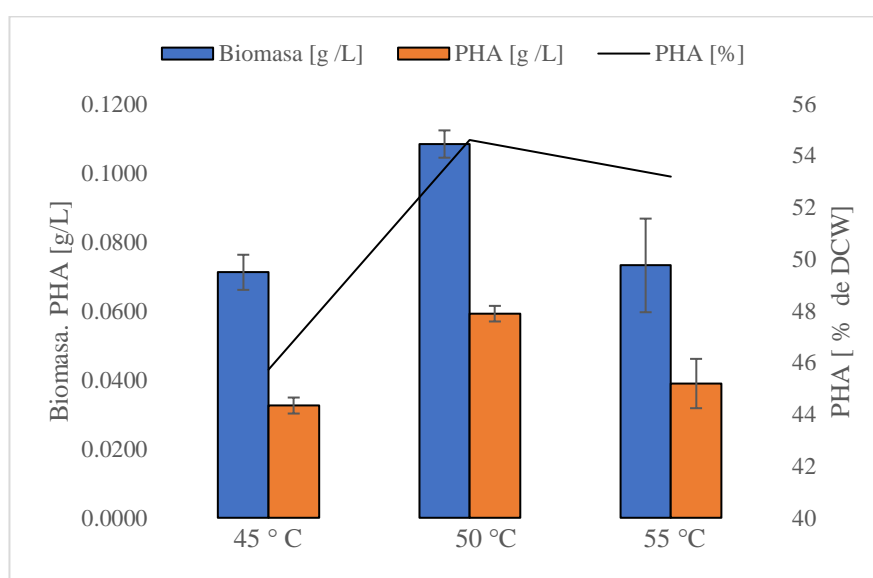


Figura 7. Producción de PHA por *A. thermoaerophilus* Q60 a diferentes temperaturas y 2 % de ARC, 72 h, 150 rpm.

El efecto de la variación en la concentración de sustrato (2, 4 y 6 % de ARC) fue otro parámetro evaluado en *A. thermoaerophilus* Q60 para mejorar la producción de PHA, considerando la temperatura de 50 °C para este aislamiento bacteriano, ya que, presentó un mejor rendimiento. En la tabla 7 y figura 8 se evidencia que a 2 % de concentración de sustrato esta bacteria fue capaz de producir 50 % más de PHA en comparación a las demás concentraciones de sustrato.

Tabla 7. Producción de PHA por *A. thermoaerophilus* Q60 utilizando diferentes concentraciones de ARC a 50 °C ,72 h, 150 rpm.

Aislamiento	ARC [%]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento de PHA [%] ¹
<i>A. thermoaerophilus</i> Q60	2	0.1084 ± 0.00	0.0592 ± 0.00	54.61 ± 0.03
	4	0.0712 ± 0.00	0.0212 ± 0.00	29.75 ± 0.04
	6	0.0732 ± 0.01	0.0330 ± 0.00	45.05 ± 0.03

Prueba de Kruskal-Wallis (*p*-valor): ¹0.102; ²0.156.

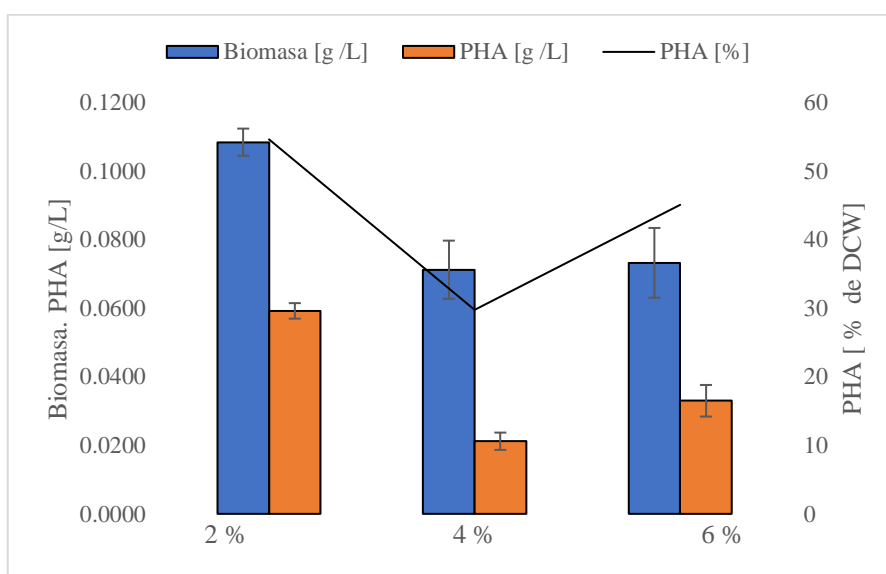


Figura 8. Producción de PHA por *A. thermoaerophilus* Q60 a diferentes concentraciones de ARC, 50 °C, 72h,150 rpm.

4.2. Discusión

En este estudio se quiso determinar el efecto de la temperatura de incubación y la concentración de sustrato en la producción de PHA por bacterias termófilas provenientes de la fuente termal de Quilcate, provincia de San Miguel, Cajamarca. La temperatura de la fuente termal de Quilcate según Huamaní (2000), oscila entre los 51- 62 °C; por ende, se consideró evaluar bajo estas condiciones de temperatura a los 106 aislamientos bacterianos obtenidos en un estudio previo.

Chavan *et al.* (2021), resaltan la importancia de utilizar bacterias termófilas en la producción de estos biopolímeros únicos (intra o extracelulares), de alto valor, denominados como PHA; estas estructuras cumplen una función muy importante para las bacterias ya que son utilizados como reserva de energía; sin embargo, también son sintetizados como protección celular en respuesta a las condiciones ambientales de estrés al que están expuestos en ambientes como las fuentes termales que alcanzan altas temperaturas, esta adaptación está regida principalmente por genes de respuesta al estrés.

Los reportes que existen de producción de PHA por bacterias termófilas son limitados y en la mayoría de investigaciones estos están enfocados en el uso de fuentes de carbonos ricos en azúcares y no en ácidos grasos como los ARC. Como nos mencionan Chavan *et al.* (2021), la composición química y características físicas del PHA están ligadas a la fuente de carbono y a la cepa microbiana empleada, los procariotas son capaces de producir más de 150 tipos de PHA según su cadena polimérica y el sustrato utilizado por la bacteria (Obruča *et al.*, 2022).

En la actualidad, la producción de PHA es una característica común entre las especies de los géneros *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Aneurinibacillus*, *Geobacillus*, *Ureibacillus* o *Thermobacillus* (Obruča *et al.*, 2022), según Tsuge, Hyakutake y Mizuno (2015), la mayoría de estas bacterias son portadoras de las sintasas de PHA de clase IV, enzima específica para la polimerización de scl-PHA. En el Screening, para determinar la producción de PHA, realizado a los 106 aislamientos bacterianos se seleccionó a *Brevibacillus* sp. Q8, *A. thermoaerophilus* Q9, *A. salavatliensis* Q15, *B. licheniformis* Q25, *A. thermoaerophilus* Q31, *A. thermoaerophilus* Q60 y *B. licheniformis* Q75 como las bacterias termófilas con mayor capacidad de producir este biopolímero utilizando ARC al 2%. La respuesta de estas bacterias fue acumular PHA en casi todo su interior citoplasmático (75 – 100 %) de citoplasma bacteriano ocupado por los gránulos de PHA, tabla 1; todas estas bacterias fueron bacilos Gram positivos formadores de esporas.

Las bacterias *B. licheniformis* Q25 y *B. licheniformis* Q75 a pesar de pertenecer a la misma especie bacteriana obtuvieron rendimientos diferentes en la producción de PHA, los cuales fueron 52.72 ± 0.03 y 29.43 ± 0.12 % del DCW, respectivamente (Tabla 3 y figura 4). De acuerdo con la tinción Negro Sudán B realizada se evidenció que estas bacterias presentaron gránulos con distintas características, lo cual sería indicativo de que pertenecerían a distintas cepas que habitan el mismo ambiente. En la evaluación microscópica se observó que el aislamiento Q25 presentaba gránulos redondos, grandes que ocupan alrededor del 85 % de su interior citoplasmático a diferencia del aislamiento Q75 en el cual presentó gránulos dispersos ocupando solo el 75 % de su citoplasma; además, este último evidenció mayor producción de esporas (Apéndice 2, figura 15), debido a la naturaleza esporulante que presentan las especies

de *Bacillus* cuando son sometidas a condiciones de estrés (Mohapatra *et al.*, 2017).

También es importante mencionar que en cuanto a las características microbiológicas ambos aislamientos bacterianos mostraron ser diferentes, lo cual refuerza la idea de que serían cepas distintas. La morfología de las colonias del aislamiento Q25 en agar Nutritivo se observó como una biopelícula cremosa, con consistencia pegajosa, extendida sobre la superficie del medio, distinta a las colonias del aislamiento Q75 que tuvieron forma rugosa, de tamaño y bordes irregulares que liberaban metabolitos en forma de gotas transparentes y pegajosas alrededor de las colonias (Apéndice 2, figura 12 y 15). Por lo tanto, si ambas bacterias presentaban características diferentes, lo cual es indicativo de que podría tratarse de dos cepas distintas, tiene sentido que la capacidad de producir PHA sea diferente. Según Rodríguez *et al.*(2022), se espera que una cepa represente un genoma o una colección de genomas que no tengan diferencias de contenido genético o de un solo nucleótido o si tales diferencias existen, se espera que no codifiquen diferencias fenotípicas importantes, en nuestro caso ambas bacterias presentan diferencias fenotípicas notables; por lo tanto, se puede inferir que si se trata de dos cepas diferentes.

De las bacterias pertenecientes a la especie *A. thermoaerophilus*, el aislamiento Q60 destaca frente a los aislamientos Q9 y Q31 en cuanto al rendimiento de PHA producido. En la figura 4 se observa el pico de rendimiento de PHA para *A. thermoaerophilus* Q60, en el cual se evidencia que más del 40 % del DCW correspondería al peso de PHA producido por la bacteria. Según las características microbiológicas y tinción Negro Sudán B, se demostró que existen diferencias notables entre estos 3 aislamientos (Apéndice 2, figura 10,13 y 14); los gránulos de

PHA del aislamiento Q60 son más grandes y se podría inferir que esta bacteria ha modificado su estructura celular, en comparación a los aislamientos Q9 y Q31 en los cuales los gránulos de PHA ocupan casi todo el citoplasma celular, pero son más pequeños y tienen forma lineal y más delgada.

En este estudio se encontró un aislamiento (Q8) que fue identificado como *Brevibacillus* sp., estas bacterias no han sido reportadas con frecuencia como productoras de PHA. Una investigación realizada por Sankhla *et al.* (2010), reportaron a *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039 como una bacteria con capacidad de producir 65 % de PHA utilizando glucosa al 2,08 %, acetato al 1,62 %, propionato al 0,75 % y 2,15 g/L de KH_2PO_4 a 30 °C. En nuestro estudio *Brevibacillus* sp. Q8 produjo 16.90 ± 0.09 % de PHA utilizando 2 % de ARC a 45 °C, y aunque el rendimiento reportado para *B. invocatus* MTCC 9039 es superior, ambas bacterias pertenecen al mismo género bacteriano, presentan capacidad para metabolizar distintas fuentes de carbono produciendo PHA con rendimiento diferentes; según Lim *et al.* (2023), en la mayoría de los casos las bacterias productoras de PHA van a mostrar mayor rendimiento utilizando como fuente de carbono glucosa.

Obruča *et al.* (2022), en su revisión bibliográfica afirman que los reportes de la producción de PHA por bacterias termófilas es limitada, y por ello optaron por realizar un análisis bioinformático de los genomas almacenados en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y GenBank en busca de los genes *phaC*, que codifican las PHA-sintasas responsables de la producción de PHA; los genomas evaluados pertenecían a bacterias termófilas y encontraron que *Anoxybacillus calidus* y *A. vitaminiphiluses* son portadores de este gen; sin embargo,

hasta la actualidad no se conocen de reportes de investigación sobre la producción de PHA por estas bacterias. Ante lo expuesto, nuestro aislamiento Q15 identificado como *A. salavatliensis* sería el primer reporte en el que se confirma la producción de PHA utilizando 2 % de ARC a 45 °C para esta bacteria (21.73 ± 0.07 % de PHA según su DCW).

Mohapatra *et al.* (2017), da a conocer que las bacterias pertenecientes al genero *Bacillus* pueden producir hasta un 90 % de PHA y que la recuperación de este es mas simple gracias a la ausencia de una capa externa de lipopolisacáridos en la estructura de estas bacterias, no obstante, uno de los inconvenientes que presentan es su naturaleza esporulante ya que al ser sometidos a condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes induce no solo la producción de PHA si no también la formación de esporas. Sin embargo, hay estudios que han bloqueado la vía de formación de esporas con la finalidad de optimizar la producción de PHA en este tipo de bacterias.

Según Inoue *et al.* (2018), la temperatura de incubación tiene un rol principal en el metabolismo celular influyendo directamente en el crecimiento celular, en la utilización de sustrato y en la producción de PHA, ya que, dependiendo de esta, el crecimiento y la producción de PHA puede variar; estos mismos investigadores señalan además, que a temperaturas muy elevadas las bacterias empiezan a degradar el biopolímero en lugar del sustrato para su crecimiento y mantenimiento celular. Por ello, es importante determinar y establecer dentro del proceso metabólico, según la especie de bacteria, la temperatura más adecuada para la producción óptima de PHA.

Lim *et al.* (2023), mencionan que el rango de temperatura óptima para la producción de PHA por bacterias termófilas o termotolerantes es de 45-55 °C y en el caso de hipertermófilas la temperatura óptima es de 60 a 75 °C. En este contexto, se justifica la propuesta de variar la temperatura de incubación de los aislamientos de este estudio, ya que, al probar las temperaturas de 45, 50 y 55 °C, en *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60, se obtuvo una mayor producción de PHA a 50 °C y ambos rendimientos fueron superiores al 50 % del DCW de cada bacteria (Tabla 4 y 6). Con esto se demuestra que encontrar la temperatura óptima para cada bacteria en evaluación es relevante.

Así mismo, la concentración de la fuente de carbono afecta directamente la productividad y el rendimiento general de PHA, ya que esta impulsa el crecimiento celular y la formación del biopolímero (Kumar *et al.*, 2020). Mohidin Batcha *et al.* (2014), en una investigación realizada concluyen que utilizar una fuente de carbono renovable rica en aceites, compuesta principalmente por ácidos grasos, tiene un efecto en la producción de PHA, ya que, una baja concentración de estos en el medio de fermentación dificulta el crecimiento celular y la acumulación de este, debido a su escasez. Por el contrario, una excesiva concentración de ácidos grasos puede inhibir el crecimiento celular, ya que esta podría acidificar el citoplasma y modificar la osmolaridad celular (Lim *et al.*, 2023).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, al evaluar el efecto de la concentración de sustrato, queda demostrado que utilizar 2 % de concentración de sustrato (ARC) favorece la producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60, obteniéndose una proporción mayor al 50 % del DCW

obtenido comparado con 4 % de ARC; para esta última concentración el rendimiento disminuyó por debajo del 30 % de PHA del DCW obtenido. Al evaluar el 6 % de ARC la producción aumentó en ambas bacterias tal como se evidencia en la figura 6 y 8; sin embargo, la cantidad de biomasa seca obtenida fue menor a 0.07 g/L (tabla 5 y 7), lo cual demuestra que altas concentraciones de ARC tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, no obstante, las bacterias mantuvieron su capacidad de producir PHA.

Los resultados obtenidos en este estudio, en cuanto a la variación de temperatura, pueden ser comparados con los hallazgos de la investigación realizada por Pernicova *et al.* (2020), quienes evaluaron un aislamiento identificado como *B. licheniformis* (bacteria considerada por los investigadores como termófila) a dos temperaturas de incubación diferentes, de 50 y 60 °C, y a una concentración de 2 % de glicerol como fuente de carbono con el fin de mejorar la producción de PHA; concluyen que a 50 °C la producción de PHA fue mayor (62.0 %) a la obtenida a 60 °C. En el caso de la bacteria *B. licheniformis* Q25 de nuestro trabajo, se obtuvo también una mayor producción de PHA (57.80 ± 0.02 %) a 50 °C utilizando 2 % de ARC. No obstante, la producción de PHA reportada por Pernicova *et al.* (2020) es mayor, esto podría deberse a que ellos utilizaron glicerol como sustrato y en nuestro caso se empleó ARC, y aunque ambos sustratos contienen ácidos grasos, el glicerol es más fácil de asimilar por las bacterias a diferencia del ARC, ya que, las composiciones químicas son diferentes (Lim *et al.*, 2023).

Sangkharak y Prasertsan (2012), con el mejor de sus aislamientos identificado como *B. licheniformis* obtuvieron el mayor rendimiento de producción de PHA utilizando

como fuente de carbono efluente de aceite de palma, en comparación con los otros residuos que emplearon (melaza, glicerol y aguas residuales municipales); esta bacteria produjo 68,80 % de PHA del DCW a 37 °C. Con el fin de mejorar la producción de PHA de esta bacteria, Sangkharak y Prasertsan (2013), indujeron un proceso mutagénico en *B. licheniformis*, y obtuvieron un mutante denominado M2-12 que aumentó 3,18 veces su producción en comparación con el tipo salvaje, utilizando 3 % de efluente de aceite de palma, a 45 °C. Si empleamos bacterias termófilas nativas, como *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60 de nuestro estudio, ya no es necesario inducir modificaciones genéticas en las bacterias para mejorar la producción de PHA, esto constituye una significativa ventaja de las bacterias termófilas frente a las mesófilas.

Uno de los primeros reportes relacionados a *Aneuribacillus* sp. como productor de PHA es el que describen Xiao *et al.* (2015), la cepa XH2 de *Aneuribacillus* aislada de un yacimiento petrolífero, es una bacteria termófila del filo Firmicutes, que presentó la capacidad de producir 26.78 % de PHA utilizando un medio de fermentación con glucosa como fuente de carbono, a una temperatura de 55 °C. En otra investigación, también realizada por Pernicova *et al.* (2020), reportaron a *Aneurinibacillus* sp. H1, una bacteria aislada de compost, descrita por ellos como moderadamente termófila, con capacidad de producir 55.31 % de PHA utilizando como fuente de carbono 2 % de glicerol a una temperatura de 50 °C.

De acuerdo con los reportes mencionados en el párrafo anterior, la producción de PHA por nuestro aislamiento *A. thermoaerophilus* Q60 a partir de ARC confirma la capacidad o preferencia que tienen bacterias de este género por fuentes de carbono

ricas en ácidos grasos, como glicerol o ARC de este estudio, con una producción de más del 50 % de PHA según el DCW, en nuestro caso al 2 % de ARC y a una temperatura de 50 °C. En el caso del reporte de *Aneuribacillus* sp. XH2, esa bacteria produjo menos del 30 % de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono a una temperatura de 55 °C. Por lo tanto, podemos concluir que utilizar una fuente de carbono rica en ácidos grasos a 50 °C estimularía una mejor producción de PHA en bacterias pertenecientes a este género.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Este trabajo demostró que la temperatura y concentración de sustrato tienen un efecto relevante en la producción de PHA por bacterias termófilas. *B. licheniformis* Q25 y *A. thermoaerophilus* Q60 obtuvieron una mayor producción de PHA a 50 °C, utilizando 2 % de ARC.

De los 106 aislamientos bacterianos obtenidos de la fuente termal Quilcate, el 82 % de estos tiene la capacidad de acumular PHA en su interior citoplasmático. *Brevibacillus* sp. Q8 y *A. salavatliensis* Q15, son reportadas por primera vez como productoras de PHA utilizando 2 % de ARC a 45 °C.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda evaluar otros parámetros, como la relación entre la fuente de nitrógeno y carbono, pH del medio y la velocidad de agitación, a fin mejorar la producción de PHA por bacterias termófilas.

Recomendamos que en próximos estudios se considere medir la actividad lipolítica de cada bacteria evaluada, para evaluar la capacidad de metabolizar sustratos que contengan ácidos grasos.

Se recomienda también que después del proceso de extracción de PHA se apliquen algún método de purificación del biopolímero obtenido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeleye, A. *et al.* (2020) ‘Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass’, *Process Biochemistry*, 96, pp. 174–193. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>.
- Akanbi, T., Agyei, D. and Saari, N. (2019) ‘Food Enzymes From Extreme Environments: Sources and Bioprocessing’, in Kuddus, M. B. T.-E. in F. B. (ed.) *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications and Future Prospects*. Academic Press, pp. 795–816. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00046-3>.
- Albuquerque, P. and Malafaia, C. (2018) ‘Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, pp. 615–625. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>.
- Bhandari, S. and Nailwal, T. (2020) ‘Exploration of microbial communities of Indian hot springs and their potential biotechnological applications’, in De Mandal, S. and Bhatt, B. (eds) *Recent Advancements in Microbial Diversity*. Academic Press, pp. 251–288. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821265-3.00011-6>.
- Cavalheiro, J. *et al.* (2012) ‘Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol’, *Bioresource Technology*, 111, pp. 391–397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>.
- Chan, C. S. *et al.* (2015) ‘Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing’, *Frontiers in Microbiology*. doi: [10.3389/fmicb.2015.00177](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00177).
- Chavan, S. *et al.* (2021) ‘A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks’, *Bioresource Technology*, 341, p. 125900. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125900>.
- Chee, J. *et al.* (2010) ‘Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics’, pp. 1395–1404.
- Chen, G.-Q. *et al.* (2015) ‘Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates’, *Trends in Biotechnology*, 33(10), pp. 565–574. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>.
- Chen, G.-Q. and Jiang, X.-R. (2018) ‘Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria’, *Current Opinion in Biotechnology*, 50, pp. 94–100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>.
- Debnath, T. *et al.* (2019) ‘Diversity of Microbes in Hot Springs and their sustainable use’, in Satyanarayana, T., Johri, B. N., and Das, S. K. (eds) *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Singapore: Springer Singapore, pp. 159–186. doi: [10.1007/978-981-13-8315-1_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_6).

- Espinal, D. *et al.* (2019) 'Producción de amilasas de *Geobacillus thermoparaffinivorans* (CB-13) aisladas de los Géiseres de Candarave, Tacna', *Ciencia & Desarrollo*, 18(1), pp. 38–44. doi: 10.33326/26176033.2019.24.783.
- Flores, A., Idrogo, E. and Carreño, C. (2018) 'Rendimiento de polihidroxicanoatos (PHA) en microorganismos halófilos aislados de salinas', *Revista Peruana de Biología*, 25(May), pp. 153–160. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14249>.
- Ganesh, R. *et al.* (2021) 'A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams', *Bioresource Technology*, 325, p. 124685. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124685>.
- Guzmán, C. *et al.* (2017) 'Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L.', *Scientia Agropecuaria*, 8(2), pp. 109–118. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03.
- Haba, E. *et al.* (2007) 'Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition', *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), pp. 99–106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.021>.
- Hahn, S. *et al.* (1994) 'Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform', *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), pp. 256–261. doi: 10.1002/bit.260440215.
- Hartman, T. (1940) 'The use of Sudan Black B as a bacterial fat stain', *Biotechnic and Histochemistry*, 15(1), pp. 23–28. doi: 10.3109/10520294009110328.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1989) 'The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*', *FEMS Microbiology Letters*, 57(1), pp. 1–6. doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03210.x.
- Huamaní, A. (2000) *Aguas termales y minerales en el norte del Perú*. Instituto Geológico Minero y Metalúrgico.
- Ibrahim, M., Willems, A. and Steinbüchel, A. (2010) 'Isolation and characterization of new poly(3HB) accumulating, star, shaped, cellaggregates, forming thermophilic bacteria', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 109(5), pp. 1579–1590. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x>.
- Inoue, D. *et al.* (2018) 'Polyhydroxyalkanoate accumulation ability and associated microbial community in activated sludge-derived acetate-fed microbial cultures enriched under different temperature and pH conditions', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), pp. 339–345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.09.008>.
- Jones, B. and Renaut, R. (2011) 'Hot springs and geysers', *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, (9781402092114), pp. 447–451. doi: 10.1007/978-1-4020-9212-1_103.
- Kalia, V. *et al.* (2021) 'Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications', *Bioresource Technology*, 326, p. 124737. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124737>.

Khanna, S. and Srivastava, A. (2005) 'Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates', *Process Biochemistry*, 40(2), pp. 607–619. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.053.

Khatami, K. *et al.* (2021) 'Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?', *Waste Management*, 119, pp. 374–388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>.

Koller, M. (2021) 'Production, properties, and processing of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters', in Das, S. and Dash, H. (eds) *Microbial and Natural Macromolecules*. Academic Press, pp. 3–55. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00001-6>.

Kourilova, X. *et al.* (2020) 'Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates', *Bioresource Technology*, 315, p. 123885. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123885>.

Kumar, M. *et al.* (2020) 'Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects', *Journal of Cleaner Production*, 263, p. 121500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>.

Li, M. and Wilkins, M. (2020) 'Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments', *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, pp. 691–703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>.

Lim, S. W. *et al.* (2023) 'Microbial valorization of oil-based substrates for polyhydroxyalkanoates (PHA) production – Current strategies, status, and perspectives', *Process Biochemistry*, 130, pp. 715–733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.013>.

Mohapatra, S. *et al.* (2017) 'Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, pp. 206–213. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>.

Mohidin Batcha, A. F. *et al.* (2014) 'Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(5), pp. 943–951. doi: 10.1007/s00449-013-1066-4.

Nanda, S. *et al.* (2022) 'Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: a review', *Environmental Chemistry Letters*, 20(1), pp. 379–395. doi: 10.1007/s10311-021-01334-4.

Nath, A. *et al.* (2008) 'Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24', *Bioresource Technology*, 99(13), pp. 5749–5755. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017>.

Obruča, S. *et al.* (2022) 'Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics', *Biotechnology*

Advances, 58, p. 107906. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>.

Obulisamy, P. and Mehariya, S. (2021) 'Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review', *Bioresource Technology*, 325, p. 124653. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124653>.

Ostle, A. and Holt, J. (1982) 'Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate', *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), pp. 238–241.

Padan, E. *et al.* (2005) 'Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1717(2), pp. 67–88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>.

Pantazaki, A., Papanephytous, C. and Lambropoulou, D. (2011) 'Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus* HB8', *AMB Express*, 1(1), p. 17. doi: 10.1186/2191-0855-1-17.

Pérez, C., López, P. and Roy, I. (2019) 'A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments', *Biochemical Engineering Journal*, 150, p. 107283. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107283>.

Pernicova, I. *et al.* (2019) 'Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains', *Bioresource Technology*, 292, p. 122028. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>.

Pernicova, I. *et al.* (2020) 'Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation', *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, pp. 698–704. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128>.

Rodriguez-Perez, S. *et al.* (2018) 'Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review', *Journal of Environmental Management*, 205, pp. 215–230. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>.

Rodriguez, L. M. *et al.* (2022) 'A natural definition for a bacterial strain and clonal complex', pp. 1–15.

Salwan, R. and Sharma, V. (2020) 'Overview of extremophiles', in Salwan, R. and Sharma, V. (eds) *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Academic Press, pp. 3–11. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00001-0>.

Sangkharak, K. *et al.* (2020) 'The production of polyhydroxyalkanoate from waste cooking oil and its application in biofuel production', *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi: 10.1007/s13399-020-00657-6.

Sangkharak, K. and Prasertsan, P. (2012) 'Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application', 182.

- Sangkharak, K. and Prasertsan, P. (2013) 'The production of polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* using sequential mutagenesis and optimization', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(2), pp. 272–279. doi: 10.1007/s12257-012-0615-z.
- Sankhla, I. S. *et al.* (2010) 'Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039', *Bioresource Technology*, 101(6), pp. 1947–1953. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.006>.
- Satoh, Y. *et al.* (2011) 'Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 111(4), pp. 811–817. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x>.
- Sharma, V., Sehgal, R. and Gupta, R. (2021) 'Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications', *Polymer*, 212, p. 123161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>.
- Sheu, D.-S. *et al.* (2009) 'Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources', *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5), pp. 289–294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.004>.
- Smith, A., Moxon, S. and Morris, G. (2016) '13 - Biopolymers as wound healing materials', in Ågren, M. S. B. T.-W. H. B. (ed.). Woodhead Publishing, pp. 261–287. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00013-1>.
- Spiekermann, P. *et al.* (1999) 'A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds', *Archives of Microbiology*, 171(2), pp. 73–80. doi: 10.1007/s002030050681.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000) 'Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters', *Progress in Polymer Science*, 25(10), pp. 1503–1555. doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6).
- Tsuge, T., Hyakutake, M. and Mizuno, K. (2015) 'Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp. 6231–6240. doi: 10.1007/s00253-015-6777-9.
- Tu, W. *et al.* (2019) 'Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by PHA-storing denitrifiers integrating PHA accumulation with nitrate removal', *Bioresource Technology*, 292, p. 121895. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121895>.
- Villano, M. *et al.* (2010) 'Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding', *Process Biochemistry*, 45(5), pp. 714–723. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.008>.
- Wen, Q. *et al.* (2010) 'Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge', *Journal of Environmental Sciences*, 22(10), pp. 1602–1607. doi: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60295-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60295-3).

Xiao, Z. *et al.* (2015) ‘Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China’, *Journal of Basic Microbiology*, 55(9), pp. 1125–1133. doi: 10.1002/jobm.201400843.

Yadav, A. *et al.* (2019) ‘Metabolic Engineering to Synthetic Biology of Secondary Metabolites Production’, in Gupta, V. K. and Pandey, A. B. T.-N. and F. D. in M. B. and B. (eds) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, pp. 279–320. doi: 10.1016/B978-0-444-63504-4.00020-7.

APÉNDICES

Apéndice 1: Filtrado del ARC

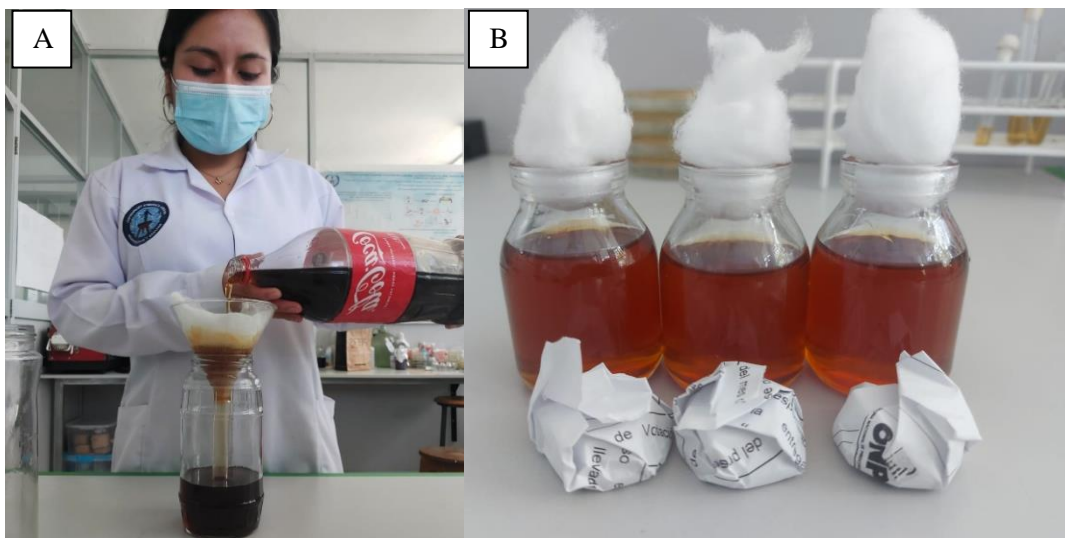


Figura 6. A) Filtrado del ARC utilizando una gasa para atrapar restos de las frituras.
B) ARC estéril.

Apéndice 2: Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA



Figura 7. Caldo PDA más 2 % de ARC.

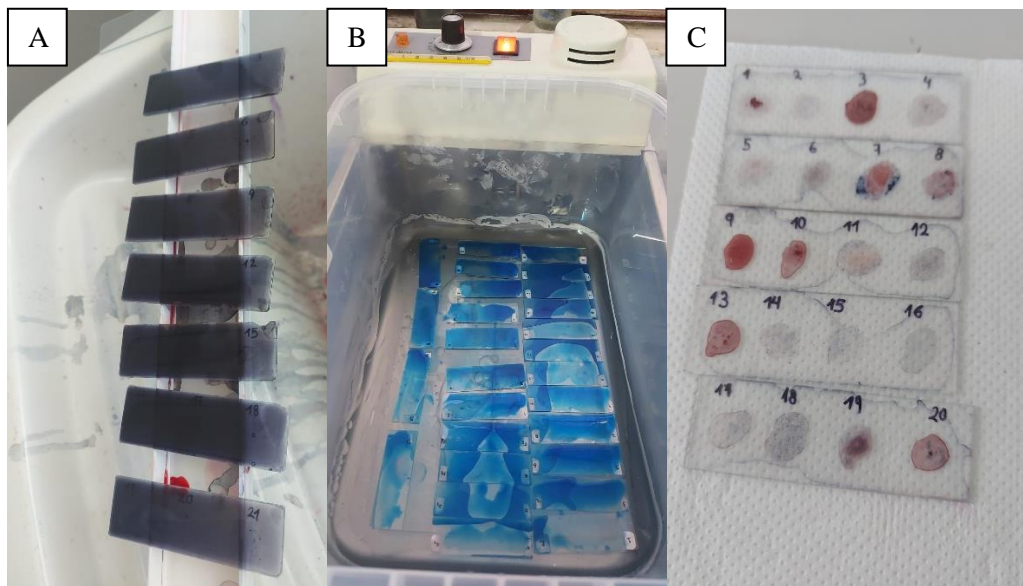


Figura 8. Screening de la producción de PHA mediante tinciones. **A)** Láminas con colorante Negro Sudán **B.** Láminas con colorante Azul Nilo en baño María. **C)** Láminas fijadas con el colorante Negro Sudán.

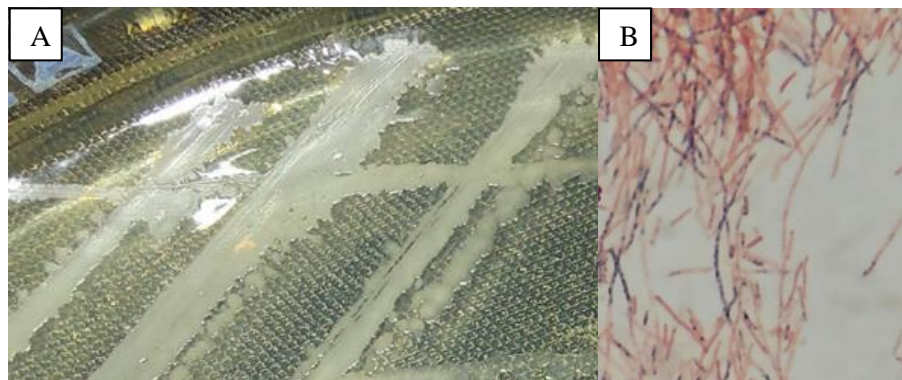


Figura 9. *Brevibacillus* sp. Q8. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

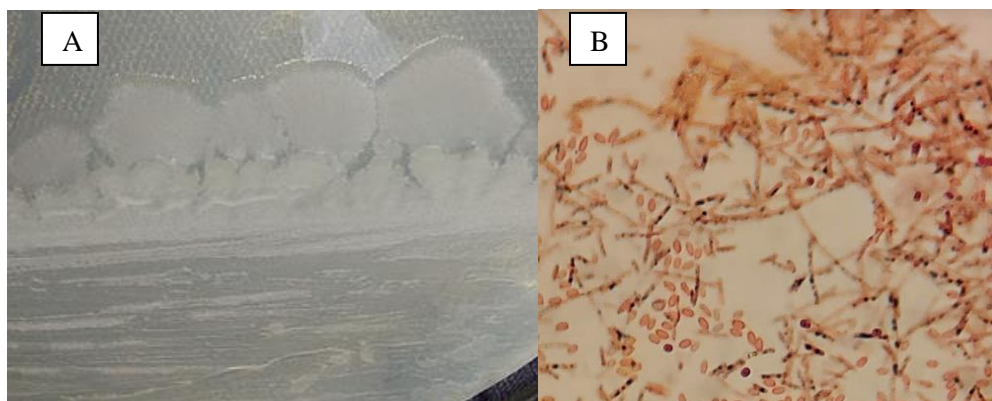


Figura 10. *A. thermoaerophilus* Q9. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

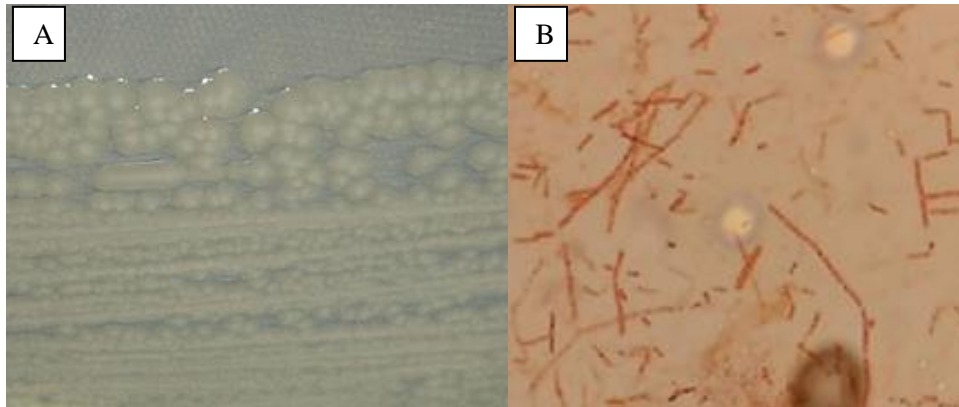


Figura 11. *A. salavatliensis* Q15. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

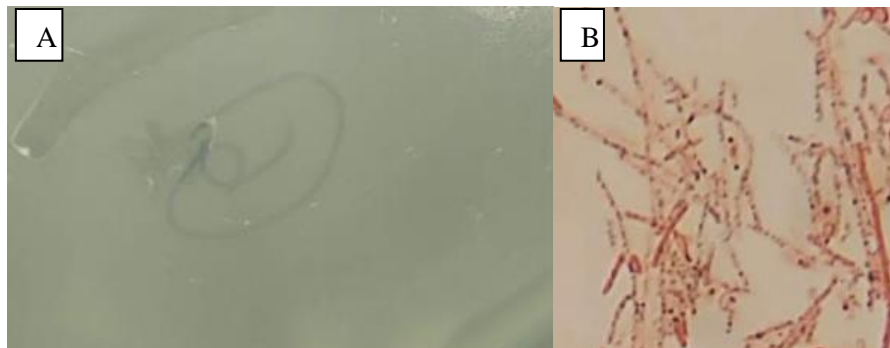


Figura 12. *B. licheniformis* Q25. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

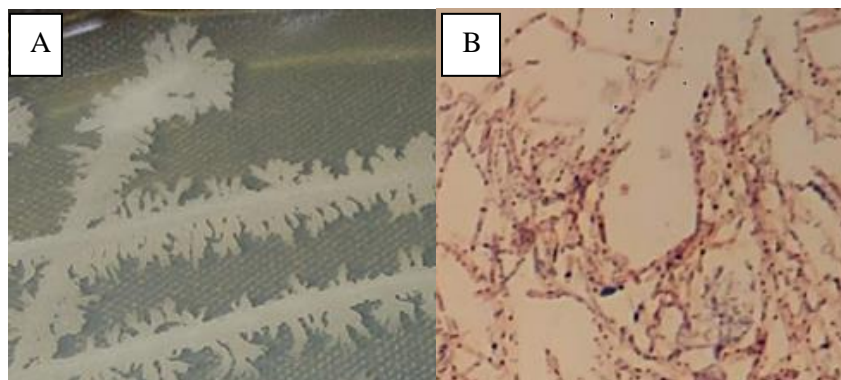


Figura 13. *A. thermoaerophilus* Q31. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

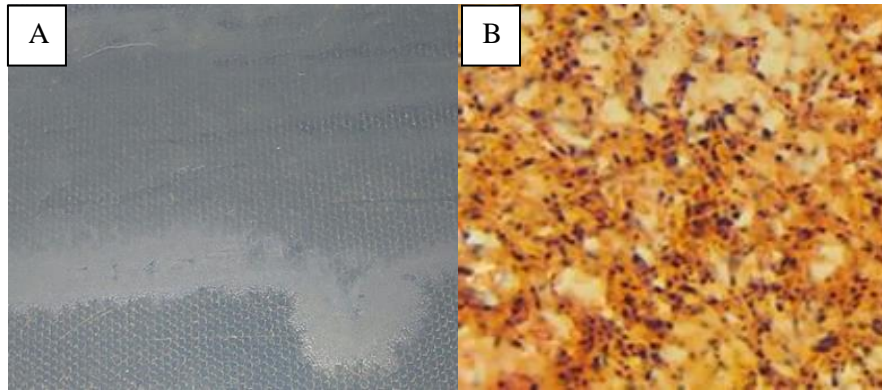


Figura 14. *A. thermoaerophilus* Q60. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

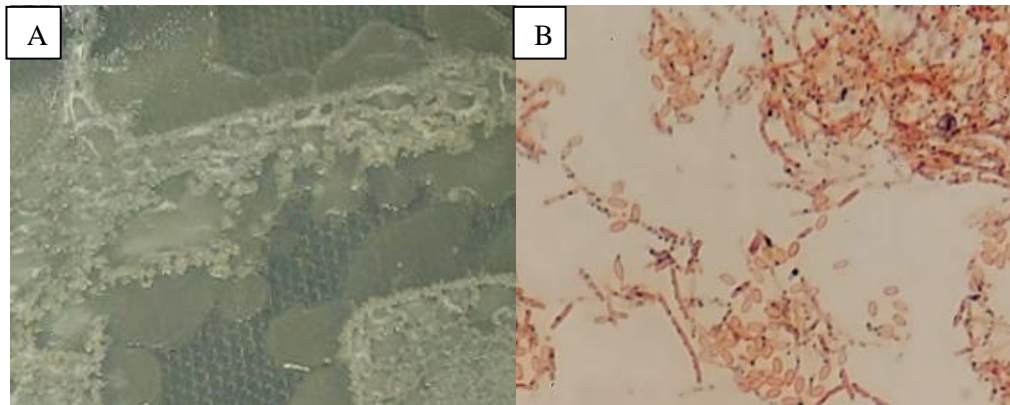


Figura 15. *B. licheniformis* Q75. **A)** Colonias en agar nutritivo. **B)** Observación microscópica de la tinción Negro Sudán B a 100X.

Apéndice 3: Screening de la producción cuantitativa de PHA

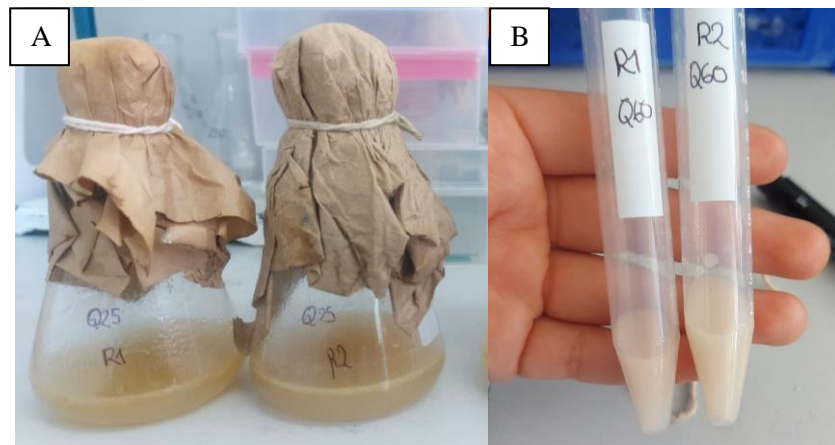


Figura 16. Determinación cuantitativa de la producción de PHA **A)** Inóculo bacteriano con 2 % de ARC después de 24 h a 45 °C a 180 rpm. **B)** Inóculo bacteriano recuperado a una concentración de 1×10^7 células/ml.

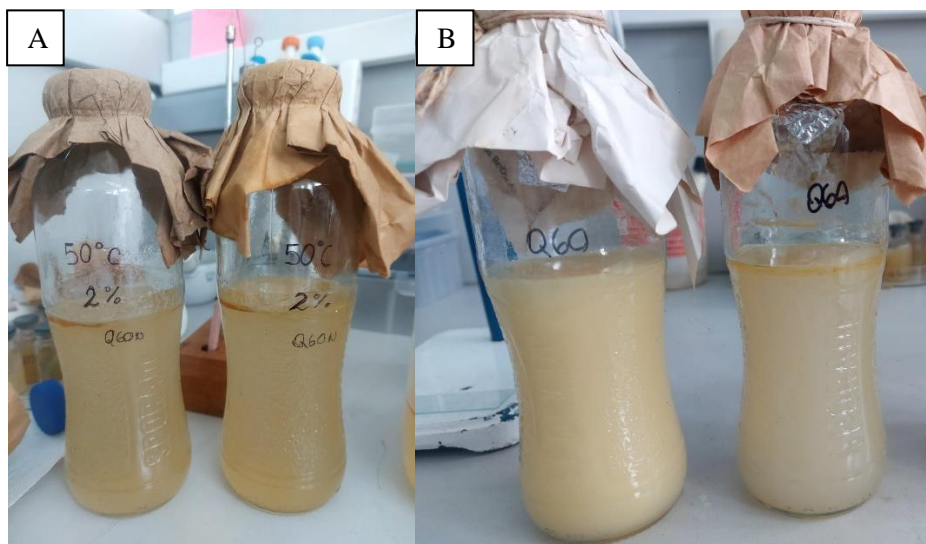


Figura 17. **A)** Medio mineral con 2 % de ARC más inóculo, antes de iniciar el proceso fermentativo. **B)** Turbidez del medio mineral de fermentación con 2% de ARC finalizado el proceso fermentativo a 50 °C, 150 rpm por 72 h.

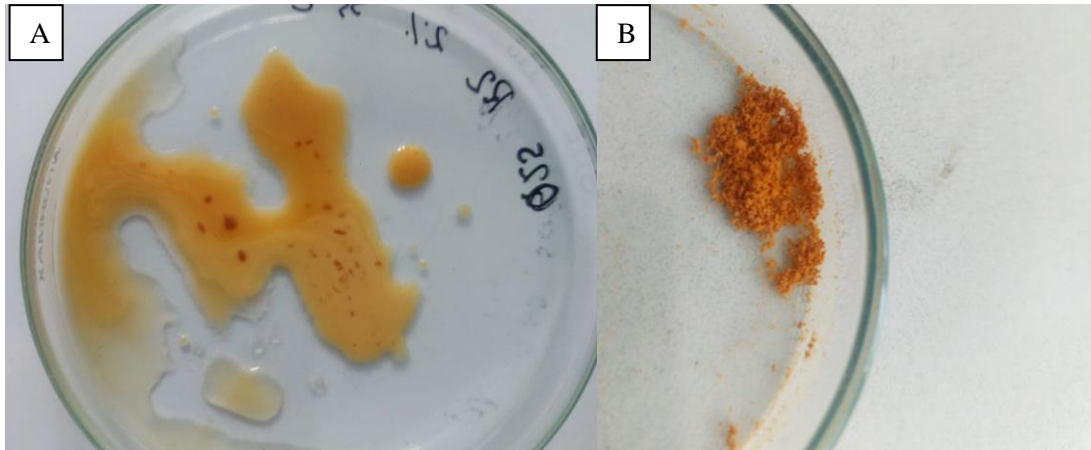


Figura 18. **A)** Biomasa obtenida por centrifugación a 3500 rpm durante 10 min (al finalizar el proceso de fermentación). **B)** Biomasa seca a 50 °C.

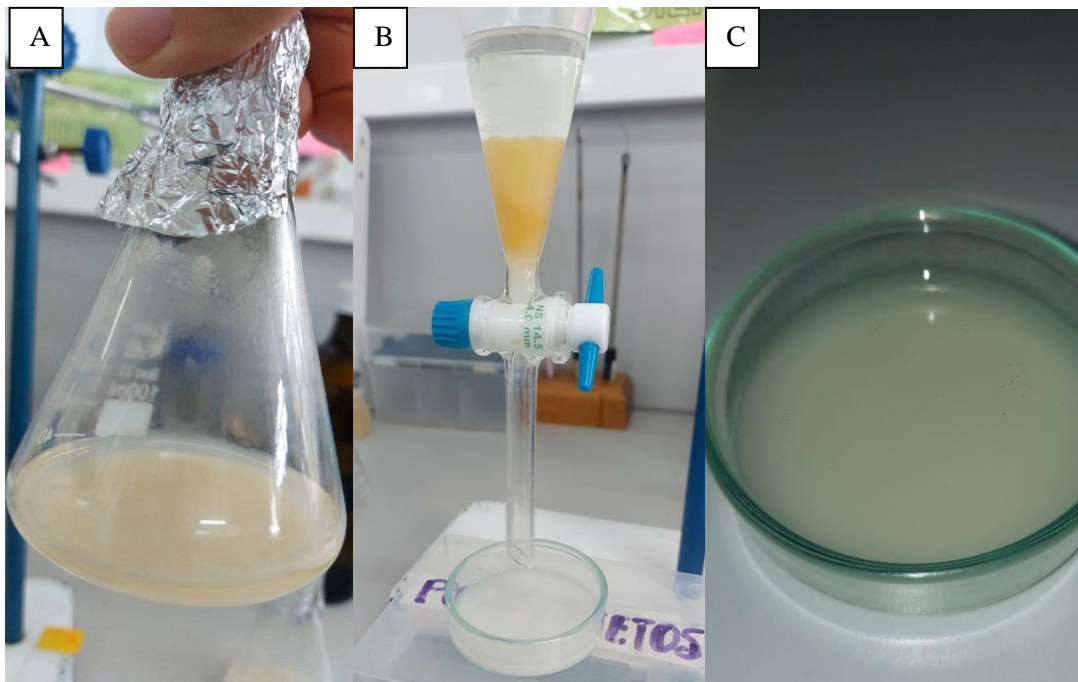


Figura 19. Extracción de PHA mediante el método de hipoclorito cloroformo según Hahn *et al.* (1994). **A)** Matraz con biomasa seca, hipoclorito y cloroformo después del proceso de extracción durante 2 h a 250 rpm. **B)** Obtención del PHA más cloroformo decantado. **C)** Cloroformo y PHA obtenido del proceso de decantación, el cual luego fue secado a 50 °C.

**Apéndice 4: Efecto de la variación de temperatura y concentración de residuos
aceitosos en la producción de PHA**

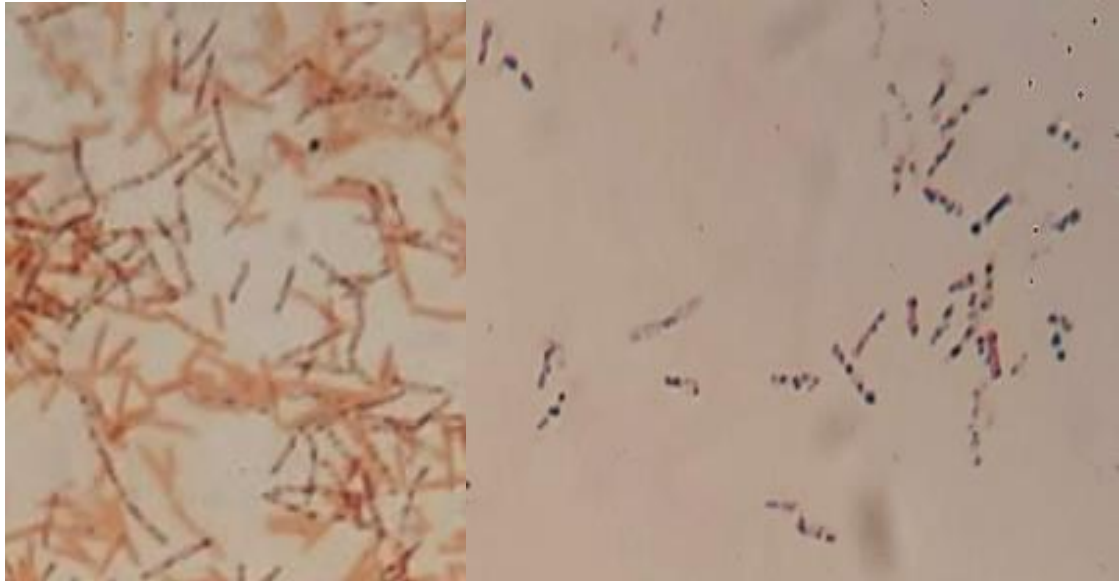


Figura 20. Tinción Negro Sudán de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo de a 50 °C, 2 % de ARC, 72 h a 180 rpm (mayor producción de PHA) a 100X.

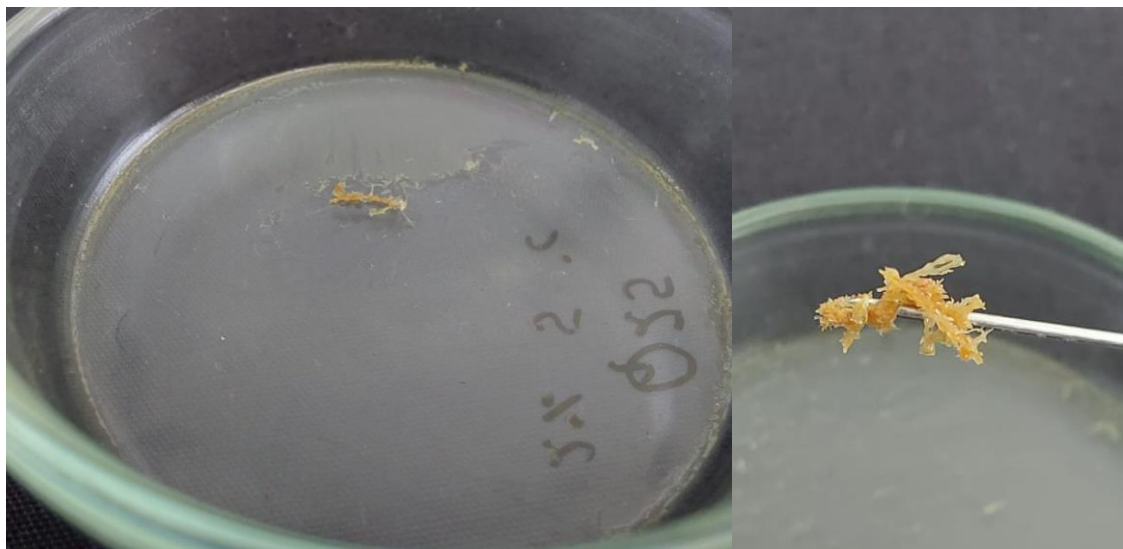


Figura 21. Polihidroxialcanoato (PHA) extraído de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso de extracción a T ° ambiente, por 2 h a 250 rpm, la cual fue cultivada a 50 ° C, con 2 % de ARC (mayor producción de PHA).



Figura 22. Tinción Negro Sudán de *A. thermoaerophilus* Q60 después de un proceso fermentativo de a 50 °C, 2 % de ARC, 72 h a 180 rpm (mayor producción de PHA) a 100X.

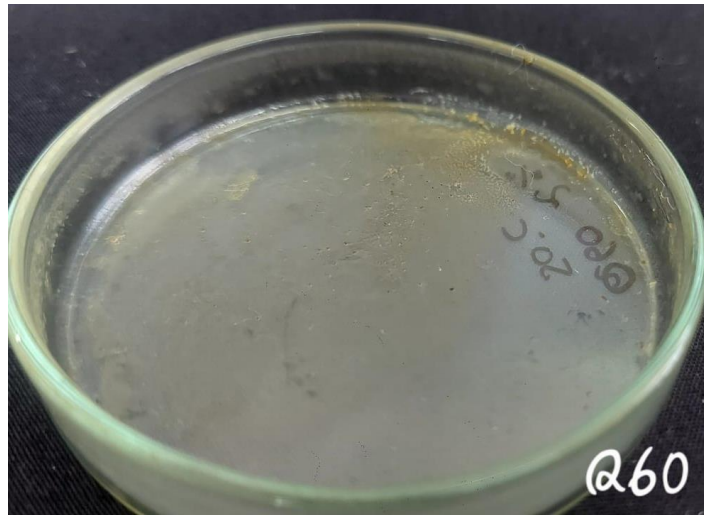


Figura 21. Polihidroxialcanoato (PHA) extraído de *A. thermoaerophilus* Q60 después de un proceso de extracción a T ° ambiente, por 2 h a 250 rpm, la cual fue cultivada a 50 °C, con 2 % de ARC (mayor producción de PHA).

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo para la tinción Negro Sudán B

Reactivos

- Solución I: Negro Sudán B (IV) al 0.33 % (p/v) en etanol 60 %.
- Solución II: Safranina al 0.5 % (p/v) en solución acuosa.

Procedimiento

1. Teñir el frotis con la solución I durante 10 min. En el caso de que se evapore, añadir más colorante.
2. Verter el exceso de colorante y lavar con agua destilada.
3. Secar con papel secante.
4. Teñir con la solución II durante 30 segundos.
5. Lavar con agua destilada secar y observar al microscopio a 1000X.

Anexo 2: Protocolo para la tinción Azul Nilo

Reactivos

- Solución de Azul Nilo al 1% en etanol (filtrar antes de su uso).
- Ácido acético al 8%.

Procedimiento

1. Primero fijar un frotis con las bacterias a evaluar.
2. Después en una bandeja para colorear se teñirán los frotis a 55 °C con la solución de Azul Nilo durante 10 min.
3. Pasado el tiempo lavar con agua corriente.
4. Además, se deberá lavar con la solución de ácido acético al 8% durante un minuto.

5. Secar el frotis del lavado al aire libre.
6. Para evitar interferencias con el aceite de inmersión usar un cubreobjetos observar a longitud de onda de 460 nm aproximadamente.
7. Los gránulos de PHB deben observarse de color naranja intenso.

Anexo 3: Protocolo para el proceso fermentativo y la extracción de PHA producido por bacterias termófilas.

Procedimiento

1. Preparar 300 mL (250 mL para la fermentación, 50 mL para pH) del medio mineral modificado con 2 % de ARC y 25 mL de caldo nutritivo para preparar el inóculo, para cada aislamiento bacteriano obtenido. Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C y luego ajustar a pH 7.
2. Para preparar el inóculo primero se debe reactivar el aislamiento bacteriano en agar nutritivo durante 24 h a 45 °C, posteriormente se inoculará un aproximado de dos asadas en el caldo nutritivo más 2 % de ARC, se dejará incubar por 18 - 24 h, a 180 rpm a 45 °C, finalmente comparar la turbidez del medio con el tubo N° 3 de Mac Farland.
3. Centrifugar el inóculo a 3500 rpm durante 10 min bajo condiciones de esterilidad para obtener recuperar las células bacterianas libres de restos del caldo nutritivo. Agregar estas células bacterianas al matraz con medio de fermentación y dejar fermentar por 72 h, 180 rpm a 45 °C. El análisis de cada cepa se hará por triplicado.
4. El fermentado obtenido se verterá en tubos Falcon de 50 ml para separar la biomasa por centrifugación a 3500 rpm por 10 min.

5. Después del proceso de centrifugación se observarán dos fases. La fase del sobrenadante y la fase constituida por la biomasa que se utilizará para la extracción de PHA. La biomasa se lavará con agua destilada y se centrifugará bajo las condiciones mencionadas en el paso anterior, se repetirá el lavado por 3 veces. Posteriormente la biomasa se secará a peso constante a 50 °C por 24 h. El peso seco de la biomasa en gramos será la diferencia entre el peso inicial de la placa y el peso final de la placa más la biomasa seca obtenida en gramos.
6. Para extraer el PHA de la biomasa seca, se utilizará el método de hipoclorito-cloroformo según Hahn *et al.* (1994). Primero, colocar la biomasa obtenida en un matraz de 125 mL y agregar 20 mL de hipoclorito de sodio comercial (CLOROX, 4.5 % de NaOCl, con pH 10) y 20 mL de cloroformo, luego colocar los matraces en un shaker a 250 rpm por 2 h a temperatura ambiente.
7. Dejar decantar los matraces después de la incubación hasta que se formen dos fases, la fase superior acuosa de hipoclorito contendrá la biomasa residual y la fase inferior del cloroformo que contendrá el polímero de PHA.
8. Finalmente, verter el filtrado en una placa Petri y colocarla en una estufa a 50 °C por 48 h. El PHA obtenido será la diferencia entre el peso inicial de la placa y el peso final de la placa más el biopolímero de PHA.